

Tamara Gracia Cazaña

Resistencias del carcinoma basocelular a la terapia fotodinámica con metil- aminolevulinato

Departamento
Medicina, Psiquiatría y Dermatología

Director/es
Gilaberte Calzada, Yolanda
Juarranz De La Fuente, María Ángeles

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

RESISTENCIAS DEL CARCINOMA BASOCELULAR A LA TERAPIA FOTODINÁMICA CON METIL- AMINOLEVULINATO

Autor

Tamara Gracia Cazaña

Director/es

Gilaberte Calzada, Yolanda
Juarranz De La Fuente, María Ángeles

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Medicina, Psiquiatría y Dermatología

2017

**Resistencias del
Carcinoma Basocelular
a la Terapia Fotodinámica
con metil-aminolevulinato**

Tamara Gracia Cazaña

Departamento de Medicina, Psiquiatría y Dermatología.
Universidad de Zaragoza

© Tamara Gracia Cazaña

Edición e Impresión: Huella Digital, SL.

Departamento de Medicina, Psiquiatría y Dermatología



**Universidad
Zaragoza**

Resistencias del Carcinoma Basocelular a la Terapia Fotodinámica con metil-aminolevulinato

Autor: Tamara Gracia Cazaña

Directores:

Dra. Yolanda Gilaberte Calzada

Prof. Ángeles Juarranz de la Fuente

Memoria para optar al grado de Doctor en Medicina

Zaragoza

2017



Dña. Yolanda Gilaberte Calzada, Doctora en Medicina y Jefe de Servicio de Dermatología en el Hospital Miguel Servet de Zaragoza.

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado "Resistencias del Carcinoma Basocelular a la Terapia Fotodinámica con metil-aminolevulinato", que presenta Dña. Tamara Gracia Cazaña ha sido realizado bajo mi dirección y reúne, a mi juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el Tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Zaragoza, 2017.

Fdo. Dra. Yolanda Gilaberte



Dña. Ángeles Juarranz de la Fuente, Catedrática del Departamento de Biología (Biología Celular) de la Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado "Resistencias del Carcinoma Basocelular a la Terapia Fotodinámica con metil-aminolevulinato", que presenta Dña. Tamara Gracia Cazaña ha sido realizado bajo mi dirección y reúne, a mi juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el Tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Zaragoza, 2017.

Fdo. Prof. Ángeles Juarranz

***El hombre nunca sabe de lo que es capaz
hasta que lo intenta.***

Charles Dickens

A mis tres hijos, vuestro cariño y amor, son los detonantes de mi esfuerzo para conseguir vuestra felicidad.

Habéis sido mi mayor motivación para desarrollar con éxito mi proyecto de tesis doctoral.

AGRADECIMIENTOS

Desde estas líneas pretendo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que durante estos años de trabajo han estado a mi lado, maestros, compañeros, amigos y familia, y que de una u otra forma han contribuido a que esta Tesis haya llegado a buen fin.

En primer lugar A la Dra. Yolanda Gilaberte, por haberme dado la oportunidad de realizar este estudio, ha sido un honor y un placer trabajar contigo por tu inmenso conocimiento sobre Terapia Fotodinámica y otros campos de la Dermatología. Tus buenos consejos, apoyo y amistad han sido una ayuda inestimable tanto en el ámbito académico como a nivel personal, por el cual estoy extremadamente agradecida.

A la Prof. Ángeles Juarranz por enseñarme a descubrir el lado asombroso de la ciencia. Por mantener la ilusión y saber encontrar la motivación a pesar de las dificultades, para seguir mejorando cada día. Le agradezco su paciencia, su cariño, sus consejos y su confianza.

Gracias a este proyecto he conocido a uno de los mejores profesionales y personas, al Dr. Jesús Vera, anatomopatólogo, por la ayuda prestada constante y por todas esas tardes que le he robado viendo piezas. Es un ejemplo a seguir.

A todos los compañeros del grupo de investigación en terapia fotodinámica de la Universidad Autónoma de Madrid, en especial al Prof. Salvador González, del que con gran orgullo y satisfacción formo parte.

A mis amigos y compañeros dermatólogos que coincidí con ellos en el Hospital Clínico Lozano Blesa durante la residencia no solo por su apoyo sino por los buenos momentos que convivimos.

A mi compañera la Dra. Pilar Sánchez Salas, por tu apoyo en todas mis iniciativas que me ayudan a mantener la ilusión y seguir luchando.

Por supuesto este trabajo no hubiese sido posible sin la colaboración desinteresada del servicio de admisión del Hospital San Jorge de Huesca, a Pilar Frías por ayudarme en el acceso a las historias clínicas de los pacientes y a M^a José Roca que ha realizado las técnicas de inmunohistoquímica y todos los cortes, por su rapidez y su disponibilidad.

A toda mi familia; a mis abuelos, porque con su dura vida de sacrificio lograron para sus hijos y nietos la vida que ellos no pudieron vivir; a mis padres, por ser los promotores de mis sueños, animarme a seguir y acabar el trabajo empezado, y por creer ciegamente en mí.

A mis hijos Blanca, Ana y Fran por todo el tiempo que les he robado en la realización de este proyecto, que prometo recuperarlo y disfrutarlo.

No puedo terminar sin dar las gracias a Esteban, mi marido, eres la persona que me da el impulso necesario, por toda la ayuda prestada, por estar siempre a mi lado en todo momento apoyándome, por tu infinita paciencia y tus sabios consejos, dándome el cariño necesario para avanzar tanto personal como profesionalmente.

FINANCIACIÓN

El desarrollo de esta Tesis Doctoral ha contado con la siguiente financiación:

- **Proyecto:** Determinación de marcadores de resistencia a terapia fotodinámica en el tratamiento de cáncer cutáneo no melanoma y búsqueda de estrategias para superarla. Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad cofinanciado por fondos FEDER.

Participantes: Hospital San Jorge (Huesca), Hospital Ramón y Cajal (Madrid), Hospital Virgen de la Victoria (Málaga), Universidad Autónoma (Madrid)

Ref.: PI15/00974.

Equipo: Juarranz de la Fuente, Ángeles (Investigador principal), Yolanda Gilaberte.

Duración: 12-31-2018 - 01-01-2016.

- **Proyecto:** Evaluación de la eficacia de la terapia fotodinámica en el tratamiento de cáncer cutáneo no melanoma mediante su combinación con terapias co-adyuvantes. Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad cofinanciado por fondos FEDER.

Participantes: Hospital San Jorge (Huesca), Hospital Ramón y Cajal (Madrid), Hospital de la Cruz Roja (Madrid), Universidad Autónoma (Madrid)

Ref.: PI12/01253.

Equipo: Juarranz de la Fuente, Ángeles (Investigador principal), Yolanda Gilaberte.

Duración: 01-01-2013 - 12-31-2015.



ABREVIATURAS

- **ADN:** ácido desoxirribonucleico
- **AINE:** antiinflamatorio no esteroideo
- **AIPcS₂₋₄:** ftalocianina de aluminio
- **Akt:** serina/treonina proteína quinasa
- **ALA:** ácido-5-aminolevulínico
- **AMP:** adenosín monofosfato cíclico
- **APAF-1:** factor 1 de activación de la proteasa apoptótica
- **APC:** gen de poliposis adenomatosa del colon
- **AXIN2:** proteína 2 inhibidora del eje
- **Bcl-2:** proteína 2 del linfoma de células B
- **BIC:** *Bayesian Information Criterion*
- **CBC:** carcinoma basocelular
- **CCNM:** cáncer cutáneo no melanoma
- **CD:** *cluster of differentiation*
- **CEA:** antígeno carcinoembrionario
- **CEC:** carcinoma espinocelular
- **cm:** centímetro
- **COX:** ciclooxigenasa
- **CPO:** caproniloxi-tetrakis metiloxietil porficeno
- **DE:** desviación estándar
- **Dhh:** *desert hedgehog*
- **DHP:** derivado hematoporfirínico
- **DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's medium*
- **DMSO:** dimetilsulfóxido
- **EB:** enfermedad de bowen
- **EE.UU:** Estados Unidos
- **EGF:** factor de crecimiento epidérmico
- **EGFR:** receptor del factor de crecimiento epidérmico
- **EMA:** antígeno epitelial de membrana
- **ERK:** quinasas reguladas por señales extracelulares
- **ERO:** especie reactiva de oxígeno
- **Et al.:** *et alii*, (y otros)
- **EVA:** escala visual analógica
- **FAK:** quinasa de adhesión focal
- **FDA:** *Food and Drug Administration*
- **FEDER:** Fondo Europeo de Desarrollo Regional
- **FGFR:** receptor del factor de crecimiento de fibroblastos
- **Fig. :** figura
- **FPS:** factor protector solar
- **FS:** fotosensibilizante
- **GABA:** ácido γ-aminobutírico

- **GADD45:** gen 45a de detención del crecimiento e inducible por daño
- **GCSF:** factor estimulante de colonias de granulocitos
- **GSK-3:** Glucógeno sintasa quinasa 3
- **Hdm2:** homólogo doble minuto murino
- **Hh:** *hedgehog*
- **HIF-1:** factor inducible por hipoxia-1
- **H&E:** hematoxilina y eosina
- **hMLH1:** *MutL Protein Homolog 1*
- **hMSH2:** *human mutS homolog 2*
- **Hp:** hematóporfirina
- **HSP:** proteínas de choque térmico
- **IAP:** proteínas inhibidoras de la apoptosis
- **IC:** intervalo de confianza
- **IFN:** interferón
- **IGF-BP3:** proteína 3 de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina
- **lhh:** *indian hedgehog*
- **IHQ:** inmunohistoquímica
- **IL:** interleuquina
- **INMD:** inmunodeprimidos
- **IPL:** luz pulsada intensa
- **J/cm²:** julios por centímetro cuadrado
- **JNK:** proteína quinasa N-terminal c-Jun
- **KC:** quimioquina derivada de queratinocitos
- **kDa:** kilodalton
- **LED:** diodo emisor de luz
- **Log:** logaritmo
- **MAL:** ácido metil-aminolevulínico
- **MAP:** proteínas asociadas a microtúbulos
- **MAPKs:** proteínas quinasa activadas por mitógenos
- **Mdm2:** doble minuto murino
- **MF:** microfilamentos
- **mg/g:** miligramos por gramo
- **MITF:** factor de transcripción asociado a la melanogénesis
- **mm:** milímetro
- **µm:** micrómetro
- **MMR:** reparación por mismatch
- **Mrp:** proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos
- **MSI:** inestabilidad de los microsatélites
- **MT:** microtúbulos
- **MT1-MMP:** metaloproteinasas de la matriz extracelular tipo 1
- **mTOR:** diana de rapamicina en células de mamífero
- **MTT:** bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazoil)-2,5-difeniltetrazólico
- **MVD:** densidad de microvasos

- **mW/cm²**: megavatio por centímetro cuadrado
- **N**: número
- **NCCN**: *The National Comprehensive Cancer Network*
- **ND-YAG**: *neodymium-doped yttrium aluminium garnet*
- **NK**: *natural killer*
- **nm**: nanómetro
- **nmol / L**: nanomol por litro
- **Npe6**: N-aspartilclorina e₆
- **O₂**: oxígeno diatómico
- **¹O₂**: oxígeno reactivo monoatómico singlete
- **OR**: *odds ratio*
- **O/W**: *Oil/Water*
- **PBS**: buffer fosfato salino
- **PdTPPo**: complejo de paladio del tetrafenilporfenceno
- **PECAM**: moléculas de adhesión plaqueta –endoteliales
- **PGD, PGE, PGF, PGI**: prostaglandina D, E, F, I
- **Pgp**: P-glicoproteína
- **PI3K**: fosfatidil inositol-3 quinasa
- **PKB**: proteína quinasa B
- **PpIX**: protoporfirina IX
- **Ptch**: patched
- **QA**: queratosis actínica
- **R**: riesgo
- **RAF**: *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*
- **RECIST**: criterios de respuesta para tumores sólidos
- **RNA_m**: ácido ribonucleico mensajero
- **RT**: radioterapia
- **RTO**: receptores de trasplante de órganos
- **RUV**: radiación ultravioleta
- **sg**: segundos
- **Shh**: *sonic hedgehog*
- **Smo**: *smoothened*
- **SNC**: sistema nervioso central
- **Sufu**: *supresor of fused*
- **TCF-1**: factor 1 de transcripción de células T
- **TFD**: terapia fotodinámica
- **TFD-LD**: terapia fotodinámica con luz de día
- **Th1**: *T helper 1*
- **TLR**: *Toll-like receptor*
- **TNF**: Factor de necrosis tumoral
- **TPPo**: tetrafenilporfenceno
- **TPPS₄**: tetra-sodio-meso-tetrafenilporfina-sulfonato
- **TXA₂**: tromboxano A2
- **VEGF**: factor de crecimiento vascular
- **VIH**: virus de inmunodeficiencia humana
- **ZnPc**: ftalocianina de zinc
- **5-FU**: 5-fluorouracilo



ÍNDICE

ÍNDICE

A. INTRODUCCIÓN	23
A.1 CARCINOMA BASOCELULAR	25
A.1.1 Definición e Historia	25
A.1.2 Epidemiología	25
A.1.3 Factores predisponentes	26
A.1.3.1 Factores ambientales y estilo de vida	26
A.1.3.2 Factores de riesgo individuales	27
A.1.4 Etiopatogenia	28
A.1.4.1 Alteraciones cromosómicas	29
A.1.4.2 Patogénesis molecular	29
A.1.4.3 Otras alteraciones genéticas o proteicas que afectan al ciclo celular	31
A.1.5 Clínica	41
A.1.5.1 Formas de comienzo	41
A.1.5.2 Formas de estado	42
A.1.5.3 Formas finales	43
A.1.6 Histopatología	43
A.1.6.1 Patrones histológicos	44
A.1.7 Inmunohistoquímica	46
A.1.8 Diagnóstico	47
A.1.8.1 Criterios dermatoscópicos	47
A.1.9 Tratamiento	48
A.1.9.1 Tratamientos Quirúrgicos	50
A.1.9.2 Tratamientos No Quirúrgicos	52
A.1.10 Evaluación y pronóstico	57
A.1.11 Seguimiento	58
A.2 TERAPIA FOTODINÁMICA	60
A.2.1 Concepto	60
A.2.2 Historia de la terapia fotodinámica	60
A.2.3 Fotosensibilizantes	61
A.2.3.1 Ácido 5 aminolevulínico (ALA)	65
A.2.3.2 Metilaminolevulínico (MAL)	65
A.2.4 Fuentes de luz en Terapia Fotodinámica	66

A.2.4.1 Penetración de la luz en los tejidos.	66
A.2.4.2 Dosimetría de la luz	68
A.2.4.3 Tipos de fuentes de luz usadas en dermatología	69
A.2.5 Fundamentos físico químicos de la TFD	70
A.2.5.1 Aspectos fotoquímicos.....	70
A.2.6 Respuesta biológica de la Terapia Fotodinámica	72
A.2.6.1 Efectos citotóxicos directos de la TFD.....	72
A.2.6.2 Efectos citotóxicos indirectos de la TFD	75
A.2.6.3 Muerte celular ocasionada por la TFD	76
A.3 TFD EN EL CARCINOMA BASOCELULAR	77
A.4 LIMITACIONES DE LA TFD.....	79
A.4.1 Dolor.....	79
A.4.2 Parámetros histológicos	80
A.4.2.1 Espesor tumoral.....	80
A.4.2.2 CBC Pigmentados, Morfeiformes, Infiltrantes Y Ulcerados	81
A.4.2.3 Hiperqueratosis	81
A.4.3 Parámetros clínicos	81
A.4.3.1 Tamaño.....	81
A.4.3.2 Localización	82
A.4.4 Variables clínicas del paciente	82
A.4.5 Variables relacionadas con el profesional que realiza la TFD	82
A.4.6 Resistencias: variables Celulares y Moleculares	83
B. JUSTIFICACIÓN	87
C. HIPÓTESIS.....	91
D. OBJETIVOS	95
E. MATERIAL & MÉTODO	99
E.1 SELECCIÓN DE PACIENTES	101
E.1.1 Diseño	101
E.1.2 Criterios de inclusión	101
E.1.3 Criterios de exclusión	101
E.2 TÉCNICA DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA	101
E.2.1 Material empleado para la realización de la técnica de TFD	101
E.2.1 Realización de la técnica de TFD	102
E.3 REVISIÓN DE DATOS.....	105

E.4 ESTUDIO DE LAS VARIABLES.....	105
E.4.1 Variables clínicas	105
E.4.2 Variables histológicas	108
E.4.3 Variables inmunohistoquímicas	111
E.5 ESTUDIO CELULAR.....	117
E.5.1 Línea celular	117
E.5.2 Tratamiento con TFD	117
E.5.3 Inmunofluorescencia Indirecta	117
E.5.4 Ensayo de migración celular	117
E.5.5 Ensayo de viabilidad celular (MTT)	118
E.5.6 Análisis de las Imágenes obtenidas de los cultivos celulares.....	118
E.6 ALMACENAMIENTO Y ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	119
E.6.1 Almacenamiento de datos.....	119
E.6.2 Análisis estadístico.....	119
E.7 TRATAMIENTO DE LA BIBLIOGRAFÍA	120
E.8 ASPECTOS ÉTICOS	120
F. RESULTADOS.....	121
F.1 VARIABLES CLÍNICAS	123
F.1.1 Características socio-demográficas y clínicas de los CBC incluidos en el estudio	123
F.1.2 Resultados de eficacia	126
F.1.3 Variables clínicas relacionadas con la TFD	127
F.2 VARIABLES HISTOLÓGICAS	129
F.2.1 Espesor tumoral	129
F.2.2 Tipo histológico	130
F.2.3 Estroma peritumoral	131
F.2.4 Pérdida de empalizada periférica	133
F.2.5 Elastosis.....	134
F.2.6 Pleomorfismo celular e invasión perineural.....	136
F.2.7 Ulceración	137
F.2.8 Necrosis intratumoral	138
F.2.9 Aumento de la vascularización.....	139
F.2.10 Infiltrado inflamatorio	141
F.3 VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS	143
F.3.1 Expresión de P53	143

F.3.2	Expresión de Ki-67	144
F.3.3	Expresión de CD-31	146
F.3.4	Expresión de COX-2	147
F.3.5	Expresión de EGFR	148
F.3.6	Expresión de β -catenina	150
F.3.7	Expresión de Survivina	152
F.4	ANÁLISIS MULTIVARIANTE	155
F.5	CULTIVOS CELULARES	157
F.5.1	Inmunofluorescencia Indirecta de P53 en ASZ y BSZ.	157
F.5.2	Migración celular de ASZ vs. BSZ.....	157
F.5.3	Resultados de viabilidad celular tras tratamiento con TFD	159
G.	DISCUSIÓN	161
G.1	VARIANTE DEL CBC Y ESPESOR TUMORAL	164
G.2	FOTOTIPO	166
G.3	NÚMERO DE SESIONES	167
G.4	EDAD	167
G.5	RECEPTORES DE TRANSPLANTE DE ÓRGANOS	169
G.6	LOCALIZACIÓN TUMORAL	170
G.7	INFILTRADO INFLAMATORIO PERITUMORAL	170
G.8	VARIABLES MOLECULARES.....	172
G.8.1	Expresión de β -catenina	172
G.8.2	Expresión de P53.....	174
G.9	LIMITACIONES.....	177
G.10	FUTURAS INVESTIGACIONES.....	177
H.	CONCLUSIONES	179
I.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	183
J.	PUBLICACIONES	209
J.1	REVISTAS CIENTÍFICAS	211
J.2	COMUNICACIONES EN CONGRESOS	212
K.	ANEXO (I)	215
SUPLEMENTO:	ARTÍCULOS PUBLICADOS	219

A



INTRODUCCIÓN

A.1 CARCINOMA BASOCELULAR

A.1.1 Definición e Historia

Debido a las diferencias epidemiológicas y pronósticas, el cáncer de piel se divide en melanoma cutáneo y cáncer cutáneo no melanoma (CCNM) que incluye fundamentalmente al carcinoma basocelular (CBC) y al carcinoma espinocelular (CEC) y a un grupo heterogéneo de tumores con menor prevalencia entre los que se incluye el carcinoma de Merkel, el linfoma cutáneo y los tumores anexiales.¹

El CBC ha sido definido como un tumor de invasión local y crecimiento lento que rara vez da metástasis y que deriva de las células pluripotentes de la capa basal de la epidermis y del epitelio folicular con diferentes formas clínicas e histopatológicas.² La primera referencia bibliográfica del CBC data de 1827, Arthur Jacobs, oftalmólogo alemán, lo definió como una úlcera erosiva de ahí el nombre de úlcera de Jacobs,³ pero hasta el año 1903 no se empezó a denominar epitelioma basocelular y fue gracias a Komprecher quien acuñó el nombre por el que hoy lo conocemos debido a sus características celulares.⁴

En base a sus características morfológicas e histológicas se le ha denominado: epitelioma aneal de Foot y Masson, epitelioma epidermoide de Lacassagne, etc. En 1959 en el Congreso de Alger con el fin de resaltar el tipo de células que lo constituyen se le denominó epitelioma basocelular, término al que se opusieron los anglosajones quienes lo denominaron Carcinoma de células basales o Carcinoma Basocelular, para resaltar la malignidad del mismo y que es el utilizado actualmente.⁴

A.1.2 Epidemiología

Es el tumor maligno más frecuente del ser humano, la incidencia absoluta es difícil de determinar, ya que el cáncer cutáneo no melanoma CCNM es generalmente excluido de los registros del cáncer. En relación con los tumores malignos cutáneos representa un 80% aproximadamente del total de los mismos.⁵ La presencia de metástasis es poco frecuente y oscila entre el 0,0028% y el 0,5%.⁶

La incidencia se está incrementando en los países desarrollados como Australia, Canadá, Estados Unidos (EE.UU) y Europa y, a pesar de que se trata de un tumor con crecimiento local y poca capacidad metastásica, su alta incidencia hace que sea un

problema de salud, con unos costes anuales; por ejemplo en EE.UU supone 500.000.000 \$.⁷

En nuestro país, hasta ahora los datos de incidencia de los que disponíamos eran escasos ya que, como hemos comentado previamente, la mayoría de los registros nacionales no recopilaban información sobre este tumor. Vilar-Coromina *et al.*⁸ en 2011 realizaron un estudio epidemiológico en Gerona en el que indicaron la incidencia que ajustada a la edad presentaba unas tasas de 44,6 por 100.000 habitantes.

Recientemente se ha llevado a cabo una revisión sistémica y un metaanálisis sobre la incidencia y mortalidad del cáncer cutáneo en España en la que estiman la tasa de incidencia global para el CBC de 113,05 (IC 95%=89,03-137,08/100.000 personas/año) (contando un solo tumor por persona y diagnóstico histológico).¹

Respecto a las diferencias entre sexos y edad; en EE.UU las tasas de incidencia en varones son de 407/100.000 y 212/100.000 en mujeres de raza blanca (con un ratio de 2:1),⁶ y se estima que dicha tasa crece a un ritmo del 3-10% anual en dicha población.

⁶ En cuanto a la edad se ha observado que es más frecuente en personas de 60 a 70 años pero se está viendo un aumento en los adultos jóvenes. Además, existen varios estudios en los que destaca un carácter más agresivo en las personas de menos de 40 años.⁹

Las áreas fotoexpuestas son las localizaciones más frecuentes hasta en un 80% de los casos. La cara y el cuello son las más afectadas y dentro de la cara la nariz, la frente y las zonas periorbitaria y auricular.¹⁰

A.1.3 Factores predisponentes^{11,12}

A.1.3.1 Factores ambientales y estilo de vida

Hay muchos estudios sobre como afecta el estilo de vida y los diferentes factores ambientales en el desarrollo de los CBCs, entre ellos destaca la exposición solar de manera crónica, y en concreto, la radiación ultravioleta (RUV) que ha sido ampliamente aceptado como el determinante más importante para el desarrollo del CBC.

Se han llevado a cabo estudios multicéntricos que comparan la incidencia de CBC y CEC en función de las horas acumuladas de exposición solar a lo largo de la vida,

comprobarse que la incidencia del CBC aumenta, cuando existe una exposición solar acumulada entre 8.000-10.000 horas a lo largo de la vida, con una ligera disminución del riesgo en exposiciones más altas (100.000 horas acumuladas o más), a diferencia del CEC que la odds ratio (OR) es hasta ocho o nueve veces para las exposiciones más altas (>200.000 horas acumuladas).¹³

La fotoprotección por lo tanto es fundamental, habiéndose llevado a cabo diferentes estudios que demuestran que la población del medio rural tiene mayor riesgo de padecer CBC debido a que es propensa al no emplear métodos de protección solar.¹⁴ Estas prácticas de fotoprotección son muy importantes ya desde la infancia, observándose que no usar medidas de protección solar física (como sombrero) en edades tempranas de la vida hace que existan más posibilidades de CBC con una OR de 2,11.¹⁵

Otros factores ambientales que influyen en la aparición de CBC son la radiación ionizante, el arsénico, algunos agentes químicos e incluso el tabaquismo.¹⁶

A.1.3.2 Factores de riesgo individuales

En un reciente estudio realizado sobre incidencia en EE.UU en 2013, se evaluaron los factores de riesgo en 140.171 pacientes, diagnosticados de CBC entre 1986 y 2006, en función del género.¹²

Como factores de riesgo comunes a ambas cohortes, se identificaron:

- Antecedentes familiares de melanoma.
- Cabello de color rubio o pelirrojo.
- Mayor número de nevus en extremidades.
- Mayor susceptibilidad de quemaduras solares en la infancia y adolescencia.
- Mayor cantidad a lo largo de la vida de quemaduras.

Otros factores relacionados con las característica epidemiológicas de los pacientes serían: la raza blanca y, sobre todo los fototipos bajos que son uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de CBC.¹⁷

Aparte de los antecedentes familiares de melanoma otros que multiplican por dos el riesgo de padecerlo son los antecedentes familiares de CCNM.

Además debemos de tener en cuenta los antecedentes personales, que se ha estimado que hasta el 45% de los pacientes diagnosticados de un CBC presentarán otro en los primeros cinco años de seguimiento.¹⁸

Otros factores de riesgo publicados son: estados de inmunosupresión (trasplantes, sida), niveles de vitamina D por encima de 75 nmol/L, nevus sebáceo de Jadasshon o nevus organoide, lesiones previas cicatriciales, léntigos solares, siringomas, etc.

17,19–22

Entre los factores predisponentes observamos que existen variaciones genéticas comunes e influencias ambientales en la mayoría de los casos. Sin embargo, se debe de sospechar un trastorno genético subyacente en aquellos pacientes con lesiones múltiples, de aparición temprana. Algunos síndromes como Gorlin, Bazex-Dupré-Christol, síndrome de Rombo, y Xeroderma pigmentoso, muestran CBCs como una característica definitoria. En otras genodermatosis pueden aparecer, aunque ya no son tan específicos, estos incluyen trastornos de las funciones de reparación en la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) (síndromes de Bloom, Werner, Rothmund-Thomson y Muir-Torre), genodermatosis que afectan a la unidad folículo-sebáceo (Brooke-Spiegler, Schöpf-Schulz-Passarge y síndrome de Cowden), en la respuesta inmune (hipoplasia de cartilago-cabello y epidermodisplasia verruciforme) y en la biosíntesis de melanina (albinismo oculocutáneo y el síndrome de Hermansky-Pudlak), otras condiciones ocasionalmente se han asociado pero la importancia de la asociación aún no se ha demostrado.²³

A.1.4 Etiopatogenia

El fenómeno de carcinogénesis del CBC es complejo, en él intervienen una serie de mutaciones que activan a oncogenes e inactivan a genes supresores, con un resultado final de una célula cancerígena que crece y prolifera escapándose de la apoptosis, multiplicándose y diseminándose.

El ciclo celular del CBC es lento, con una duración de la fase S de 19,2 horas frente a 10,2 horas en piel normal,²⁴ la disminución de la replicación del ADN puede explicar el crecimiento tumoral lento. Las diferentes hipótesis que se le ha dado a este fenómeno son que existe una mayor presencia de sustancia amiloide en los CBCs que determina que sean menos agresivos frente a los agresivos con menos amiloide, la presencia de un menor número de células en apoptosis y, en relación con esto, un aumento de los

cuerpos de Councilman que contienen remanentes celulares condensados.²⁵ Incluso un 20% los CBCs presentan regresión espontánea por la necrosis y apoptosis. En las zonas tumorales se ha observado un aumento del infiltrado inflamatorio, predominantemente de linfocitos T CD4 con actividad Th1 y con un aumento del receptor para IL-2, además de una importante expresión de IL-2, IFN- γ y TNF- β . Cuando estos linfocitos se activan inducen la apoptosis de las células del CBC.²⁶

A continuación describimos las principales alteraciones cromosómicas, moleculares y las mutaciones genéticas que se han descrito implicadas en su etiopatogenia.

A.1.4.1 Alteraciones cromosómicas

Se han realizado estudios citogenéticos que ponen de manifiesto que los cromosomas del CBC presentan aneuploidías en un 19% de ellos frente a un 82% en los CECs.²⁷

La inestabilidad de los microsatélites (MSI) constituye una alternativa a la inestabilidad cromosómica, directamente implicada en la carcinogénesis. Esta es causada por mutaciones en los genes de reparación MMR (*mutations in mismatch repair*) principalmente en hMLH1 y hMSH2. Se ha intentado estudiar la implicación de MSI en paralelo con la acumulación de P53 en los CBCs, observándose que está presente solo en un pequeño porcentaje de los mismos y por lo tanto no tiene tanta influencia en su patogenia como P53, tal y como se describirá mas adelante.²⁸

A.1.4.2 Patogénesis molecular

Vía de señalización celular «Hedgehog» o vía del erizo:

La vía de señalización Hedgehog (Hh) se identificó inicialmente en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Una mutación en el gen Hh que está presente en esta especie da lugar a un embrión de la mosca cubierto por espinas, motivo por el cual se le denominó en inglés hedgehog o erizo.²⁹

Es una vía de señalización dependiente de proteólisis regulada, altamente conservada en la evolución filogenética y muy importante durante el desarrollo embrionario, en el crecimiento y diferenciación celular.²⁹ En los tejidos adultos se encuentra inactivada y se mantiene activa en las células madre. Las mutaciones en esta vía están implicadas en enfermedades como la ciclopía, defectos en las extremidades, en el sistema

nervioso central (SNC), etc. En el tejido adulto se relacionan con distintos tipos de cáncer entre ellos el CBC.

En la figura 1 se resumen las proteínas implicadas en esta vía de señalización. Se han descrito tres moléculas activadoras (ligandos) de la vía de señalización de Hedgehog en vertebrados que son Indian Hedgehog (Ihh, expresado en intestino y condrocitos), Desert Hedgehog (Dhh, expresado en las células de Sertoli) y Sonic Hedgehog (Shh, relacionado con muchos procesos de desarrollo y mejor conocido).²⁹

La vía de señalización Hh está compuesta por 3 elementos clave: ligandos Hedgehog, el receptor inhibitorio Patched (Ptch) y el receptor de señal smoothened (Smo).

La proteína Patched (Ptch) es el receptor de Shh. Es una proteína transmembrana de doce dominios, regulador negativo de la vía. De esta proteína se han encontrado dos homólogos en vertebrados: Ptch1 y Ptch2.

La proteína Smoothened (Smo), posee siete dominios transmembrana, regula positivamente la vía y se encuentra permanentemente activada en ausencia de Ptch. Smo activa a los factores de transcripción Gli.

Gli es una familia de factores de transcripción dependientes de Zn^{++} (Gli-1, Gli-2 y Gli-3) que actúa como un protooncogen asociado a glioma. Estos factores penetran en el núcleo promoviendo a su vez la transcripción de genes de crecimiento celular, los cuales a su vez, a través de un mecanismo de retrocontrol o feedback negativo, controlan a Ptch y al propio Gli. Todo ello conlleva una activación de la vía Sonic Hedgehog con un resultado final de proliferación, apoptosis y/o diferenciación epidérmica.³⁰ Cuando los factores de transcripción Gli están proteolizados actúan como inhibidores de la transcripción. Su proteólisis depende de su unión a microtúbulos y a las proteínas denominadas Sufu (supresor of fused) que impiden la activación de los genes diana de la vía Hh.²⁹

Esta vía está siempre inactivada, pero cuando se activa por mutaciones tiene un papel importante en el inicio de neoplasias; en el caso del CBC se encuentra activada por la inactivación de Ptch1.³¹

En los CBCs esporádicos se ha comprobado que contienen mutaciones en la vía Hh provocadas por la RUV. Esto ocurre en un 80% por la inactivación de Ptch1, en un 10% por la ganancia de función en Smoothened y solo en un 1% por mutaciones en

Sufu. Los CBCs que se producen en el Síndrome del nevo basocelular casi siempre presentan mutaciones en el gen *Ptch1*, al igual que ocurre en los pacientes con xeroderma pigmentoso.³⁰

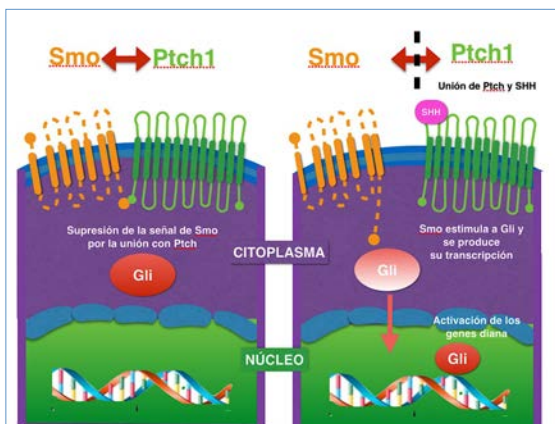


Fig.1 El receptor proteico transmembrana Patched 1 (*Ptch1*) está unido a una proteína transmembrana Smo. En ausencia de ligando, el receptor *Ptch1* reprime la actividad de Smo; si se une el ligando, la represión de SMO desaparece y ello resulta en la modulación y activación de los factores de transcripción Gli que se traslocan al núcleo promoviendo la transcripción de genes como Gli-1, marcador principal de la vía de señalización Hh.

A.1.4.3 Otras alteraciones genéticas o proteicas que afectan al ciclo celular.

A pesar de que casi todas las publicaciones sobre la etiopatogenia del CBC se atribuyen a las mutaciones de genes implicados en la vía Hedgehog, como *Ptch* o *Smo*, existen otros mecanismos implicados en el desarrollo de la carcinogénesis del CBC.³² Como todas las neoplasias, el CBC se origina a partir de diferentes mutaciones en genes que actúan en su proliferación, apoptosis y en aquellos que se encargan de su reparación.³³

La carcinogénesis es un proceso secuencial en el que mecanismos como la activación de protooncogenes, la inactivación de supresores tumorales y la sobreproducción de factores de crecimiento (regulados por receptores específicos de membrana o de señalización celular), conllevan a la aparición de los tumores.³³

Con el fin de estudiar el comportamiento biológico del CBC que influye en su respuesta a terapia fotodinámica (TFD), se describen a continuación los diferentes marcadores usados en el presente estudio, que han demostrado previamente su relación en la génesis del CBC.

Antígeno de proliferación Ki-67

La actividad proliferativa está aumentada en los tumores malignos, lo cual puede ser valorado mediante la detección inmunohistoquímica de Ki-67. En los tumores humanos se ha detectado una relación directa entre el incremento de la expresión de Ki-67, una mayor agresividad y peor pronóstico del tumor.³⁴

Este antígeno es una proteína nuclear que se expresa en las fases activas del ciclo celular: G2, S y M, de todas las células que se encuentran en proliferación, siendo prácticamente indetectable en G0 y en la primera etapa de G1.³⁵ En la figura 2 se representa el ciclo celular.



Fig. 2 Esquema que representa las fases del ciclo celular.

En el CBC el número de células Ki-67 basaloides positivas por campo de gran aumento (x400) es de 51,25 (DE=6,06). Este número de células positivas es mayor que en el tricoepitelioma pero menor que en el CEC.³⁶

Además se ha observado un mayor índice proliferativo en los CBC más agresivos y en los recurrentes.^{37,38}

Gen supresor tumoral: P53

El gen P53 codifica una proteína (P53) que se une a otros genes modulando su expresión, por lo que se le ha denominado el guardián del genoma, siendo fundamental para la reparación del ADN. Es el gen que con mas frecuencia se encuentra mutado en los diferentes tipos de cáncer.³⁹ Esta proteína de 53 kDa actúa como regulador negativo de la proliferación celular. El gen que la codifica se localiza en el cromosoma 17p. La pérdida de su función normal supone un evento crítico en el desarrollo y evolución tumoral y ocurre a través de una sucesión de eventos, típicamente mutaciones, seguidas de pérdida de heterozigosidad.³⁹

En condiciones normales, cuando el ADN se daña se activa P53, el cual asimismo activa a otros genes, como p21, GADD45, mdm-2 e IGF-BP3, deteniendo el ciclo celular en G1 y reparando el ADN, (fig. 3). Sus mutaciones pueden afectar a uno o a los dos alelos. Cuando afecta solo a uno, la célula se hace mas resistente a la apoptosis y si afecta a los dos escapa de esta. En la mitad de los tumores se observan mutaciones en los dos alelos.

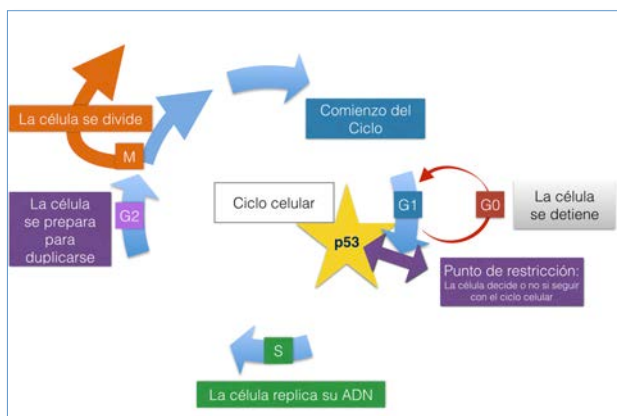


Fig. 3 Representación de la fase en la que actúa P53 en el ciclo celular.

La proteína P53 tiene una vida media muy corta de menos de 20 minutos, por lo que en condiciones normales no se puede detectar su presencia, pero las mutaciones del gen aumentan su vida media, y por tanto su acumulación en la célula, lo cual permite su detección mediante técnicas de inmunohistoquímica. En tumores humanos esta

pérdida de la función de P53 supone una ventaja para el crecimiento y la selección de clones tumorales.⁴⁰

Este gen está frecuentemente mutado / inactivado en las primeras etapas del cáncer de piel inducidos por la RUV.^{39,40} Así, las mutaciones en P53 se han detectado en el 33% de pacientes coreanos y en un 50% los pacientes de raza caucásica,⁴¹ e incluso en piel sana peritumoral.⁴² Además existen diferencias de expresión de P53 entre los CBCs agresivos y pobremente agresivos, los cuales tienen mutaciones en un 92% y un 42% de los casos, respectivamente.⁴³

Ciclooxigenasa 2: COX-2

La ciclooxigenasa (COX) es una enzima que permite la conversión del ácido araquidónico a prostanoideos (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂, TXA₂). Las principales funciones de estos son la inflamación, la oncogénesis, la reproducción celular, la apoptosis y la angiogénesis. Hasta el momento se han descrito 2 isoformas de la ciclooxigenasa, COX-1 y COX-2, ambas comparten una homología de hasta el 60%.⁴⁴

Entre las funciones de COX-1 destacan la protección gástrica, el tono vascular, la vasodilatación renal, además de la producción de prostanoideos proagregantes y tromboxano en las plaquetas.⁴⁵

Por su parte, COX-2 aumenta en una amplia variedad de tumores: esófago, estómago, mama, endometrio,⁴⁶ páncreas,⁴⁷ pulmón no microcítico,⁴⁸ colorrectal,⁴⁹ carcinoma de vejiga y de vías urinarias,⁵⁰ adenocarcinoma de prostata,⁵¹ y tumores de cabeza y cuello.⁵² Además, se ha estudiado el aumento de su expresión en queratosis actínicas (QAs), CEC y CBC⁵³ y en general, en situaciones relacionadas con procesos inflamatorios.⁵⁰

En procesos vinculados a la inflamación o a la carcinogénesis, COX-2 es activada mediante la unión a un receptor de superficie acoplado a la proteína G que induce cambios en los niveles de AMP cíclico intracelular y de calcio. Esta activación se ha visto como un evento temprano del proceso de carcinogénesis. Su sobreexpresión en diferentes tumores se ha visto que está relacionada directamente con la del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) a través de las especies reactivas de oxígeno (EROs).⁵⁴

La COX-2 y su relación con los diferentes tumores cutáneos es un tema de actualidad

principalmente por el uso de inhibidores de la enzima, como son los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en el tratamiento de los mismos. Los AINEs inhiben el desarrollo de carcinomas escamosos, principalmente al inhibir a PGE_2 cuyas funciones, mediadas por las vías Ras/Raf/MAPK, son inhibir la apoptosis y favorecer la proliferación tumoral y la angiogénesis.⁵⁵ Además su uso tópico, como es el AINE diclofenaco al 3% en combinación con ácido hialurónico, ha demostrado que es eficaz en el tratamiento de las QAs.⁵⁶

Isoherranen *et al.*⁵⁷ demostraron que la exposición a UVB induce expresión de ácido ribonucleico mensajero (RNAm) de COX-2 en células HaCaT, sin embargo el de COX-1 permanece estable, considerándose, por tanto, un marcador de daño solar.

En el caso del CBC, se ha observado que los niveles de expresión de COX-2 y P53 son significativamente mayores en 40 casos de CBCs localizados en el párpado que los de lesiones precancerosas. Estos resultados demostraban que la sobreexpresión de COX-2 y P53 podrían promover la proliferación de células tumorales e inhibir su apoptosis, sugiriendo que las mutaciones en P53 podrían aumentar los niveles de expresión de COX-2, encontrándose una relación directa entre ambas proteínas.⁵⁸

Este mismo dato ya se había dado con anterioridad, en un estudio en el que se determinó un aumento en la expresión de ambas proteínas en un 80% de los CBCs.⁵⁹ Karagece Yalçın *et al.*⁶⁰ obtuvieron resultados similares, encontrando asociación entre COX-2 y P53 pero que la expresión de COX-2 no se relacionaba con la agresividad del CBC. No obstante, Sivriköz *et al.*⁶¹ sí observaron una asociación estadísticamente significativa con la agresividad y la invasión, siendo el CBC infiltrante el que expresaba mayores niveles de COX-2.

Por último, la relación de COX-2 y la angiogénesis ha sido debatida con anterioridad, y Tjiu *et al.*⁶² demostraron una correlación entre ambas y el número de macrófagos asociados al tumor.

Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico: EGFR

EGFR es una glucoproteína transmembrana de 179 kDa, que por primera vez se descubrió en células de origen epitelial.

El EGFR pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa que engloba 4 subtipos: Her1 (EGFR, ErbB1), Her2 (Neu, ErbB2), Her3 (ErbB3), and Her4 (ErbB4).⁶³

La unión de ligandos al EGFR provoca una dimerización del receptor que a su vez favorece la activación y fosforilación de tirosina quinasa, dando lugar a la proliferación celular.⁶⁴

La vía de señalización que conlleva a esta proliferación es la activación de Ras-Raf-MAP (*mitogen activated protein kinase pathway*).⁶⁴ Otra vía que se promueve con la activación de este receptor es la del fosfatidilinositol 3-quinasa y Akt, (fig. 4).⁶⁵

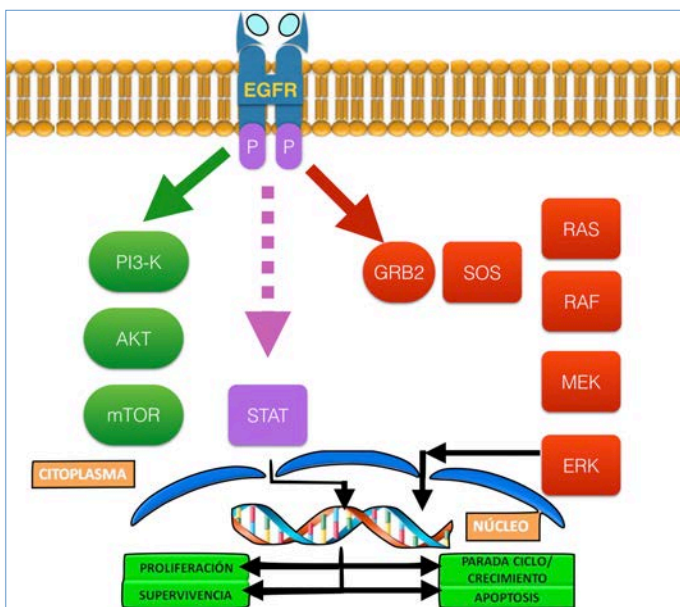


Fig. 4 Esquema en el que se representan las diferentes vías de activación del EGFR.

En el caso del CBC, Rittie *et al.*⁶⁶ observaron diferencias en expresión del EGFR en CBC y en CEC, siendo mayor en CEC que en CBC y que en piel normal, sin observarse diferencias entre estos dos últimos. Sin embargo, la expresión de EGFR se encontraba aumentada en la piel adyacente al tumor del CEC y del CBC frente a piel normal sin tumor. Estos resultados demuestran que la señalización de ErbB1 está potenciada en el CEC pero no en el CBC por lo tanto el tratamiento diana que bloquea el EGFR sería mas eficiente en CEC que en CBC.

No obstante, se ha comprobado que el EGFR tiene una interacción sinérgica con la

vía Hedgehog. Eberl *et al.*⁶⁷ mostraron que la inhibición de la señalización del EGFR reducía el desarrollo de CBCs, convirtiéndose los inhibidores de EGFR, en una alternativa muy útil para la combinación con inhibidores de Smo cuando los CBCs se han vuelto resistentes a estas dianas terapéuticas. Además, este receptor puede ser empleado como factor pronóstico, ya que el aumento de su expresión se correlaciona con tumores recurrentes.³⁸ Este hecho ya se ha descrito en muchos otros tumores en los que su expresión está en relación directa con peor pronóstico y mayores tasas de recidivas.⁶⁸

Proteína antiapoptótica: Survivina

La survivina, está codificada por un gen que se localiza en el cromosoma 11 y contiene cuatro exones. Perteneció a la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), su expresión antagoniza la muerte celular inducida por P53 y el gen que la codifica se reprime transcripcionalmente por P53.⁶⁹ Se ha hipotetizado que esta función la realiza bloqueando los procesos de apoptosis dependientes de la caspasa 9 y de la cascada Smac/DIABLO. Además de sus funciones antiapoptóticas, tiene un papel fundamental en la regulación del ciclo celular y en la estabilidad de los microtúbulos.⁷⁰ El gen de la survivina genera cinco isoformas principales con diversas funciones.⁷¹

Se detecta principalmente en el núcleo de células madre de la piel, en melanocitos y en fibroblastos. Además, survivina tiene un papel importante en la regulación del ciclo de los queratinocitos protegiéndoles de la apoptosis inducida por la RUV. En las células no tumorales humanas del adulto, el gen de la survivina se encuentra desactivado, pero en las células tumorales se reactiva y permite que las células transformadas escapen a los mecanismos de control, lo que lleva a la progresión tumoral. Por lo tanto la survivina se encuentra sobreexpresada en muchas neoplasias, siendo indetectable en la mayoría de los tejidos sanos diferenciados.⁷¹

Generalmente survivina se expresa en el citoplasma de las células normales, mientras que en diferentes tumores presenta una localización nuclear, sobre todo de las lesiones de alto grado. Ello sugiere que existe una translocación nuclear de esta proteína que se interpreta como un proceso temprano en la transformación maligna.⁷²

Las diferentes localizaciones de la proteína podrían estar relacionadas con sus funciones, (fig. 5):

En el espacio extracelular: inhibe la apoptosis, incrementa la proliferación celular y la agresividad tumoral.

En el citoplasma: la survivina en esta localización no tiene capacidad citoprotectora.

En la mitocondria: inhibe la apoptosis y promueve la carcinogénesis.

En el núcleo: promueve la entrada en el ciclo celular y por tanto la mitosis, sin capacidad citoprotectora.⁷¹

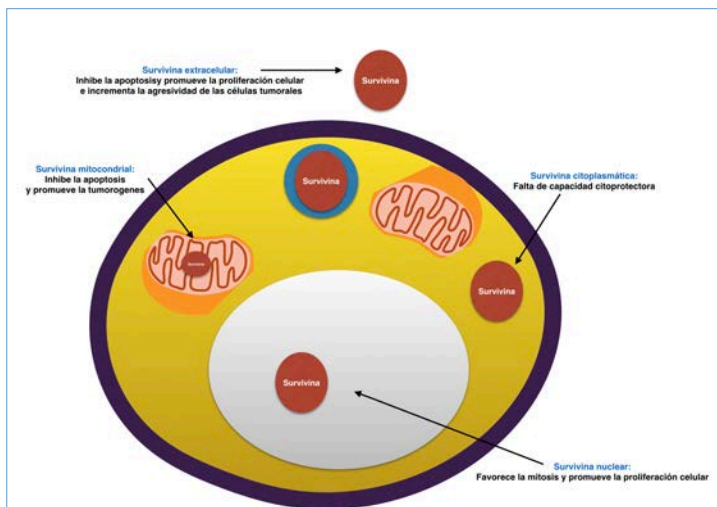


Fig. 5 Representación gráfica de las diferentes localizaciones de la survivina y su función.

Se ha comprobado que los CBCs expresan débilmente survivina y lo hacen el 40% frente al 80% de los CECs.⁷³⁻⁷⁵ En el melanoma, la survivina se expresa abundantemente, y su localización celular varía dependiendo del espesor del tumor y la invasividad. Por lo que su expresión parece estar aumentada en los tumores más agresivos.⁷⁵

Angiogénesis y CD-31

Aunque numerosos estudios han establecido la asociación entre angiogénesis tumoral y metástasis, fueron Weidner *et al.*⁷⁶ quienes en 1991 propusieron que la vascularización de un tumor podía ser utilizada como criterio para predecir su agresividad.

El primer estudio comparando la angiogénesis en CBC y en CEC,⁷⁷ describió una asociación entre la densidad de microvasos (MVD) y mayor diámetro y ulceración del tumor y descenso de la supervivencia del paciente.

Por otro lado, destaca la ausencia de correlación entre MVD con la profundidad de la invasión y la diferencia cualitativa entre los patrones de angiogénesis tumoral. Así, mientras que en el CBC los vasos estaban en el estroma peritumoral, en el CEC se localizaban peri e intratumorales. Chin *et al.*⁷⁸ propusieron un modelo en el cual los tumores invasivos inducen un estroma con angio y linfangiogénesis y en los que la MVD se correlaciona con el pronóstico.

La diferencia en la angiogénesis en CBC y CEC, valorada mediante el uso de marcadores endoteliales (CD-31) y de neoangiogénesis (CD-105),⁷⁹ indica una mayor neoangiogénesis en los CBCs agresivos frente a los nodulares, estos frente a los superficiales, y estos a su vez tenían un menor número de MVD si se comparaban con los CECs. Los autores concluyen que ambos marcadores pueden ser indicativos de tumores con mayor agresividad.

Asimismo, se ha comprobado que la expresión de CD-31 es mayor en CBC recurrentes frente a primarios y este resultado se relaciona, además, con su agresividad. Por lo tanto, se puede hipotetizar que CBCs con alta expresión de CD-31 son mas agresivos y mas resistentes a los distintos tratamientos.³⁸

Además, se ha atribuido la angiogénesis a la presencia de macrófagos. Tjiu *et al.*⁶² observaron que el número de macrófagos que infiltran el CBC se correlaciona con la profundidad de invasión, densidad microvascular medida con CD-31, y la expresión de COX-2. In vitro demostraron que estos macrófagos inducían la secreción de la COX-2, FGFR (*Fibroblast growth factor receptor*), VEGF-A (*Vascular endothelial growth factor*) y el aumento de la angiogénesis.

Vía de señalización Wnt- β -catenina

La vía de señalización Wnt- β -catenina juega un papel decisivo en los procesos de regulación, diferenciación, proliferación y muerte celular. Como consecuencia, esta vía está involucrada en numerosas anomalías del desarrollo embrionario, del crecimiento y de la homeostasis.

Esta vía interrelaciona con un significativo número de vías de señalización celular, entre ellas Notch, Hedgehog, Rac/K-RAS y mTOR. La actividad de la vía de señalización Wnt- β -catenina depende de la concentración citoplasmática de β -catenina. Lo normal es que esta proteína se localice a nivel de membrana plasmática, en las estructuras de adhesión célula-célula mediadas por E-cadherina.

La proteína se mantiene en bajas concentraciones en el citoplasma, ya que aquella que no forma parte de los complejos es degradada gracias a un proceso dependiente de ubiquitina-proteosoma y en el que participa un complejo proteico formado, entre otras, por APC y GSK-3 β . La llegada del ligando Wnt activa la vía inhibiéndose la fosforilación de β -catenina y, por ende, su degradación vía proteosoma. El incremento de β -catenina citoplasmática favorece su translocación al núcleo en donde activa la transcripción de genes específicos como MYC y ciclina D1, lo que podría alterar la proliferación, (fig. 6).⁸⁰

En el caso de los CBCs se ha comprobado que los mismos, muestran acumulación nuclear de β -catenina, lo que se relaciona con una mayor proliferación tumoral.⁸¹ Esto se ha hipotetizado que puede ser debido a la desregulación en la vía Hh que regula la expresión de Wnt; aunque no se descarta que ocurran mutaciones que estabilicen la proteína.

En el CBC además de un aumento de la β -catenina nuclear,⁸² hay evidencia de un aumento de Wnt, correlacionándose su expresión con los niveles de expresión de β -catenina citoplasmática.⁸³ Además se ha visto en la piel circundante tumoral un aumento de Wnt5A.⁸¹ Esta proteína junto a Wnt7A, pueden antagonizar la vía Wnt a través de la proteína GSK-3 β .⁸³

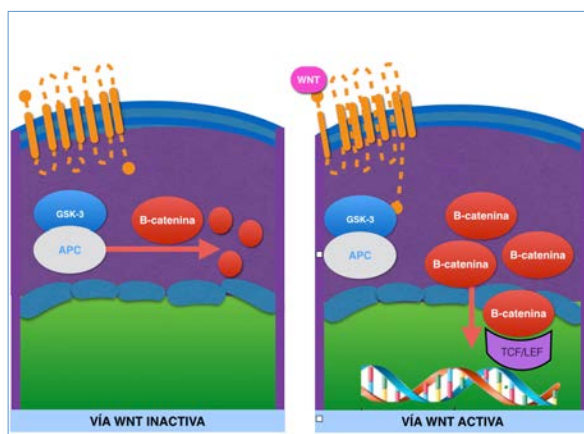


Fig. 6 Vía de señalización Wnt, la transducción de β -catenina es regulada por sus niveles en el citoplasma y pueden translocarse al núcleo. Los niveles de β -catenina a su vez son controlados por Wnt; si no hay señal de Wnt β -catenina se inactiva a través de GSK3/APC provocando su degradación; si esta en su forma activa, se transloca al núcleo donde se une a co-activadores de la transcripción génica.

A.1.5 Clínica

El CBC es un tumor que puede adoptar un aspecto clínico muy variado por lo que existen muchas clasificaciones. La principal clasificación se basa en su momento evolutivo: formas de comienzo, formas de estado y formas finales.⁸⁴

A.1.5.1 Formas de comienzo

Formas superficiales: se localizan generalmente en el tronco. Son lesiones con escasa sintomatología y crecimiento muy lento. Podemos diferenciar tres subtipos:

- Superficial eritematoso: Aspecto eritematoso perlado localizado preferentemente en tronco y extremidades.
- Superficial pagetoide: color grisáceo con escamas y costras en superficie, localizado en extremidades y tronco.
- Superficial esclerodermiforme: de aspecto blanco nacarado, también llamado morfeiforme por su similitud a una placa de morfea, se suele localizar en la cara.

Formas perladas o nodulares: son las mas frecuentes y se presentan como una tumoración circunscrita, infiltrada eritematosa o blanco-amarillenta; es la característica “perla”. Puede aparecer una variante que se denomina perlada ulcerada.

Ulcus rodens: es una forma de comienzo en la que el CBC está ulcerado desde el principio. Suele manifestarse como una úlcera que no responde al tratamiento, (fig. 7).



Fig. 7 Carcinoma basocelular ulcerado desde el inicio, correspondiente a la forma clínica denominada: *Ulcus Rodens*.

A.1.5.2 Formas de estado ¹¹

CBC nodular: es el más frecuente representando aproximadamente un 50% de todos los CBCs. Clínicamente se trata de una lesión tumoral perlada eritematosa con telangiectasias arboriformes en su superficie. En ciertas ocasiones podemos ver que tiene un centro mas deprimido y lo denominamos CBC nodular ulcerado, (fig. 8).



Fig. 8 CBC nodular de color rosado, de aspecto perlado localizado en el cuello.

CBC quístico: su frecuencia es de hasta un 8%, su superficie es lisa con algunas telangiectasias y puede confundirse clínicamente con quistes.

CBC superficial: constituyen el 9 al 11% de los CBCs; se presentan como una placa eritemato-escamosa localizada generalmente en extremidades y tronco. Este tipo tiene una alta tasa de recurrencia influenciada por el sitio anatómico, la histología, los márgenes positivos y el tipo de tratamiento.⁸⁵

CBC pigmentado: constituyen el 6% del total y se presentan como tumores de coloración marrón-negra, siendo más frecuentes en pacientes con fototipos oscuros. El pigmento no interfiere en su pronóstico, pero si que nos puede dificultar su diagnóstico por su similitud al melanoma en la clínica, (fig. 9).



Fig. 9 Placa de color marrón claro y marrón oscuro que corresponde a un CBC superficial pigmentado.

CBC esclerodermiforme o morfeiforme: constituyen el 2% del total. Se presentan como una placa rosada o blanquecina dura a la palpación, similar al aspecto de una placa de morfea o de esclerodermia.

CBC gigante: por definición es el que mide mas de 10 cm y preferentemente se localiza en el tronco, siendo más frecuente en alcohólicos y fumadores.

A.1.5.3 Formas finales

Corresponden a estadios terminales a los que se llega por la negativa de los pacientes a recibir tratamiento o bien porque el tratamiento recibido ha sido ineficaz. Se denomina CBC terebrante, es de peor pronóstico y se localiza con frecuencia en las suturas embrionarias, por las cuales penetra, infiltrando cartílago y hueso.

A.1.6 Histopatología⁸⁶

Existen unos criterios histológicos comunes para el diagnóstico de cualquiera de las formas clínicas de CBC, que son:

- El tipo de células que lo constituyen, que son de pequeño tamaño, con núcleos redondeados u ovales, usualmente monomorfos y de escaso citoplasma. Son las denominadas células basaloideas.
- La disposición de las células en la periferia de los agregados tumorales, que al menos focalmente, son columnares y ordenadas de tal forma que recuerdan a una empalizada.
- El estroma peritumoral es muy característico con una retracción que es artefactual, delimitando los islotes tumorales. Mas de la mitad de los CBCs poseen cantidades variables de amiloide, provocados por la degeneración de los tonofilamentos de los queratinocitos.

A.1.6.1 Patrones histológicos

CBC nodular: islotes grandes de células basales, formando grandes nidos de células, con el característico patrón en empalizada periférico, (fig. 10 A).

CBC superficial: también denominado multifocal ya que está formado por pequeños islotes tumorales en dermis papilar con zonas de unión a la epidermis, (fig. 10 B).

CBC nódulo-quístico: se trata de islotes grandes de células basales en las que pueden tener en su interior dilataciones quísticas. Se encuentra amiloide (sustancia amorfa, acidófila, positiva para rojo Congo).

CBC adenoide: células basaloideas con un patrón reticular que en algunas zonas forman estructuras pseudoglandulares.

CBC queratinizante: en su interior se aprecian quistes y globos córneos, es indistinguible del tricoepitelioma familiar.

CBC pigmentado: en este tipo de tumor, la pigmentación puede deberse a melanocitos dendríticos y macrófagos en el estroma y/o a melanofagia.

CBC metatípico: se aprecia en el interior de los islotes de células basaloideas, células escamosas; también se le ha denominado Basoescamoso.

CBC morfeiforme o esclerodermiforme: los islotes son pequeños y finos con un estroma que lo rodea denso y esclerótico simulando una morfea. Los islotes pueden invadir los espacios perineurales.

CBC Infiltrativo: agregados de células basales formando unos islotes mal definidos, con poca mucina en su estroma. Crece de manera expansiva con cierto tropismo por los espacios perineurales, (fig. 10 C).

CBC micronodular: constituido por islotes pequeños de células basales con escaso estroma en los que muchas veces se encuentra ausente la grieta de retracción del estroma con el tumor. En esta variante histológica podemos encontrar la forma infiltrativa micronodular con altas tasas de recurrencia, (fig. 10 D).

Estos tres últimos subtipos generalmente muestran un comportamiento más agresivo, por la extensión subclínica del tumor, crecimiento expansivo localmente destructivo, con mayores tasas de recidivas y peor respuesta a los tratamientos.⁸⁷

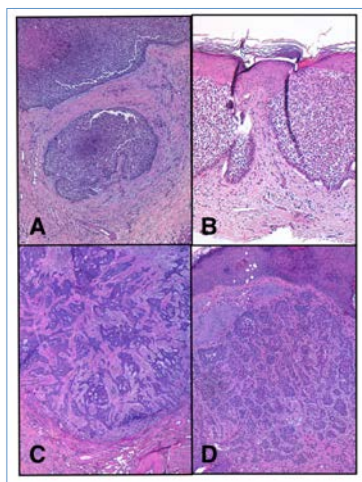


Fig. 10 Subtipos histológicos. A. CBC nodular (H&E x20); B. CBC superficial (H&E x10); C. CBC infiltrativo (H&E x20); D. CBC micronodular (H&E x20).

Otras variantes histológicas menos frecuentes:

- **Fibroepitelioma de Pinkus:** es un tumor que afecta generalmente a individuos con una edad entre los 40 y 60 años y su localización habitual es el tronco. En muchas ocasiones plantea el diagnóstico diferencial con lesiones benignas tales como acrocordón, nevus melanocítico intradérmico, neurofibroma y queratosis seborreica, etc.

- **CBC pleomórfico o de células gigantes:** con células atípicas pero que no tienen significado pronóstico.
- **CBC de células claras:** dentro de las células se pueden apreciar gránulos eosinófilos intracitoplasmáticos. Se considera que adquieren este aspecto claro por un proceso degenerativo.
- **CBC con células en anillo de sello:** con núcleos lateralizados dando esta apariencia de anillo. Se pueden apreciar focos de queratinización. La inmunohistoquímica ayuda a su diagnóstico ya que son positivos para S-100, proteína glial fibrilar ácida y actina lo que puede atribuirse a una diferenciación mioepitelial.
- **CBC granular:** el aspecto granular de sus células se debe a los gránulos citoplasmáticos eosinófilos.
- **CBC con diferenciación anexial:** pudiendo simular estructuras de la unidad foliculo-sebáceo-apocrina o bien una diferenciación ecrina.
- **CBC infundíbulo-quístico:** se trata de un CBC con diferenciación folicular. Es más frecuente en personas mayores y todo un reto a la hora de diferenciarlo histológicamente del tricoepitelioma y el hamartoma folicular basalioide.
- **CBC con diferenciación matricial:** las células se diferencian hacia células de la matriz del folículo piloso, por ello se debe de hacer diagnóstico diferencial con el pilomatrixoma.
- **CBC queloideo:** pequeñas hileras de células basaloideas rodeadas de un denso estroma, clínicamente simula a una cicatriz queloide.
- **CBC con membrana basal engrosada:** que rodea a los islotes, se debe de diferenciar de neoplasias anexas benignas.
- **CBC con células neuroides en empalizada:** sus células se asemejan a las células de Schwann, pero son S-100 negativas y citoqueratinas positivas.

A.1.7 Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica (IHQ) constituye en la actualidad una herramienta diagnóstica fundamental en dermatopatología, sin embargo no es necesaria en muchos casos

para diagnosticar un CBC, pero en ocasiones nos puede ser de gran ayuda en aquellos diagnósticos diferenciales más complicados.⁸⁸

A veces, neoplasias constituidas por cordones epiteliales de células basales inmersos en un estroma desmoplásico plantean el diagnóstico diferencial entre CBC morfeiforme, tricoepitelioma desmoplásico, CEC trabecular indiferenciado, carcinoma anexial microquístico y carcinoma siringoide. La mayoría de los carcinomas basocelulares muestran positividad para el CD-10 en sus células neoplásicas, pero el carcinoma basocelular morfeiforme solo muestra una débil inmunotinción para el CD-10 en las células del estroma tumoral. Además, los fibrocitos del estroma del tricoepitelioma desmoplásico también expresan CD-10.⁸⁹ CD-10 es una metaloproteinasas de cinc que originalmente se identificó en las células de leucemia linfoblástica aguda, su expresión también se ha demostrado en tumores con diferenciación folicular.

En estos casos puede ser útil el estudio inmunohistoquímico del BerEp4, que marca el epitelio neoplásico de casi todas las variantes histopatológicas del CBC, pero no el del tricoblastoma o el del CEC. Las tinciones para Antígeno carcinoembrionario (CEA) y Antígeno epitelial de membrana (EMA) nos permitirán detectar pequeñas formaciones ductales del carcinoma anexial microquístico o del carcinoma siringoide.⁹⁰

El CD-34, es una sialomucina cuya síntesis está codificada por un gen situado en el cromosoma 1q32, se emplea principalmente como marcador endotelial y en el diagnóstico diferencial de tumores de partes blandas. En dermatopatología se ha propuesto para diferenciar un tricoblastoma de un CBC ya que se observa positividad de este marcador en los fibrocitos del estroma del tricoblastoma, pero no en los del CBC.^{90,91}

A.1.8 Diagnóstico

Aunque el diagnóstico del CBC generalmente se realiza con la clínica, nos podemos ayudar de la dermatoscopia para lograr un rápido diagnóstico diferencial del mismo.

A.1.8.1 Criterios dermatoscópicos⁹²

Para poder emplear criterios dermatoscópicos, en primer lugar deberá de estar ausente la red pigmentaria como criterio de lesión melanocítica. En segundo lugar, debe hallarse al menos uno de los siguientes criterios específicos del CBC:

- **Patrón vascular típico:** dilatación vascular, incluyendo a los vasos arboriformes y los vasos cortos truncados, (fig. 11).
- **Ulceración:** únicas o múltiples que se producen por la pérdida parcial o total de la epidermis o dermis superior.
- **Estructuras en forma de hoja o digitiformes:** también llamadas estructuras en hoja de arce. Son prolongaciones bulbosas de color azul-gris o marrón-gris, localizadas de manera preferente en la periferia.
- **Grandes nidos ovoides azul-gris:** son estructuras redondeadas u ovaladas, de límites netos de color azul-gris, (fig. 11).⁹³
- **Múltiples glóbulos azul-gris:** son similares a los nidos pero de menor tamaño, generalmente se distribuyen en forma agrupada.
- **Áreas radiadas o estructuras en rueda de carro:** son estructuras localizadas en la periferia del tumor, constituidas por un eje central oscuro del cual parten proyecciones radiadas de color azul, gris o marrón, según la localización del pigmento.

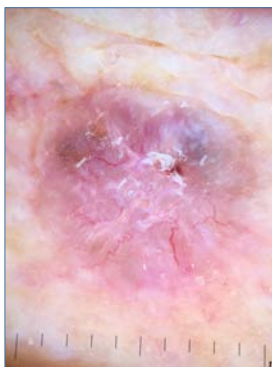


Fig 11. Imagen obtenida con dermatocopia de epiluminiscencia de un CBC nodular en la que se aprecian vasos arboriformes, ulceración y glóbulos azul grises.

A.1.9 Tratamiento^{94,95}

Dentro del tratamiento del CBC tenemos diferentes alternativas terapéuticas como la radioterapia (RT), la criocirugía, la TFD, la quimioterapia tópica o sistémica y la escisión quirúrgica, que es la más usada y la que tiene menos tasas de recurrencias.

Las guías clínicas proponen dividir el CBC de acuerdo a los criterios de riesgo (R) de recurrencia, (tabla 1). Entre ellos se encuentran:⁹⁶

- **Tamaño tumoral:** mayor tamaño, mayor riesgo de recurrencia.
- **Localización del tumor:** *área de alto riesgo:* zona central del rostro, párpados, cejas, región periorbitaria, nariz, labios, barbilla, mandíbula, áreas pre y retroauricular, genitales, manos y pies. *Área de riesgo intermedio:* mejillas, frente, cuero cabelludo y cuello. *Área de bajo riesgo:* tronco y extremidades.
- **Márgenes clínicos:** lesiones mal definidas presentan mayor riesgo.
- **Subtipo histológico:** formas agresivas: morfeiforme, forma infiltrante y metatípica o características histológicas de agresión: la invasión perineural.
- **Fracaso de tratamientos previos:** lesiones recurrentes tienen mayor riesgo.
- **Inmunosupresión:** este factor no es un factor pronóstico claro.

Riesgo bajo	Riesgo intermedio	Riesgo alto
<i>CBC superficial primario</i>	<i>CBC superficial recurrente</i>	<i>Forma clínica de CBC: morfeiforme o mal definida.</i>
<i>CBC nodular:</i> < 1 cm en zona de R intermedia < 2 cm en zona de R bajo	<i>CBC nodular:</i> < 1 cm en zona de R alto > 1 cm en zona de R intermedia > 2 cm en zona de R bajo	<i>CBC nodular:</i> > 1 cm en zona de R alto
<i>Tumor de Pinkus</i>		<i>Formas histológicas agresivas</i> <i>Formas recurrentes diferentes a CBC superficiales</i>

Tabla 1. Resumen de la clasificación de los CBCs según su riesgo bajo, intermedio o alto de recurrencia.

Aguayo-Leiva *et al.*⁹⁷ proponen simplificar la clasificación previa y dividirla en dos grupos, de bajo y alto riesgo. En esta clasificación se añade el papel de la radioterapia (RT) como factor pronóstico, (tabla 2).

Resistencias del Carcinoma Basocelular a la TFD con MAL

T. Gracia Cazaña

	Riesgo bajo	Riesgo alto
Localización / Tamaño	Área L < 20 mm	Área L ≥ 20 mm
	Área M < 10mm	Área M ≥ 10mm
	Área H < 6 mm	Área H ≥ 6 mm
Bordes	Bien definidos	Mal definidos
Primario vs. Recurrente	Primario	Recurrente
Inmunosupresión	No	Sí
Lugar de RT previa	No	Sí
Patrón histológico	Nodular, superficial	Morfeiforme, esclerosante, infiltrativo, micronodular
Invasión perineural	No	Sí

Tabla 2. Resumen de la clasificación de los CBCs según su riesgo bajo o alto de recurrencia y las variables relacionadas con esta. **Área H:** zona central del rostro, párpados, cejas, región periorbitaria, nariz, labios, barbilla, mandíbula, áreas pre y retroauricular, genitales, manos y pies. **Área L:** mejillas, frente, cuero cabelludo y cuello. **Área M:** Tronco y extremidades.

A.1.9.1 Tratamientos quirúrgicos ⁹⁵

Cirugía excisional

Es la extirpación del tumor con márgenes de seguridad. Se considera que los márgenes deben de ser de 4 mm en los CBCs de bajo riesgo y 10 mm en los de alto riesgo. Se considera el tratamiento de elección, *gold standard*, de los CBCs por dos motivos. El primero es que permite obtener los mayores porcentajes de curación comparados con otros tratamientos; se ha comprobado que en tumores de menos de 2 cm cuando se extirpan con 4 mm se curan el 95% de los casos. ⁹⁸ En segundo lugar, facilita el control histológico de los márgenes del tumor (la sensibilidad del estudio histológico convencional de los márgenes tumorales en CBCs es solo del 44%). ⁹⁹ Se han estudiado los márgenes de CBCs localizados en la cara extirpados con menos de 1 cm de diámetro, con 1, 2 o 3 mm de diámetro y se mantienen márgenes positivos en un 16%, 24% y 13% respectivamente. ⁹⁹

Algunos autores sugieren que en tumores mayores de 2 cm con patrón histológico esclerodermiforme, infiltrativo, mixto o en aquellos recurrentes sería necesario márgenes mayores de 5-10 mm, para obtener márgenes libres en un 95%. ¹⁰⁰

Se considera un buen tratamiento para los CBCs primarios (grado de recomendación A, nivel de evidencia I).⁹⁵ Los tumores que han sido extirpados de forma incompleta, especialmente aquellos de alto riesgo y cuando afectan el margen de profundidad, tienen un riesgo de recurrencia alto por lo que deben de ser reextirpados, (Grado de recomendación A, nivel de evidencia II-a).⁹⁵

Cirugía micrográfica de Mohs

Descrita por primera vez por Frederic E. Mohs en 1941. Está técnica permite analizar el 100% de los bordes y respetar lo máximo posible el tejido sano. La confirmación al microscopio de unos márgenes quirúrgicos libres de tumor es mucho más específica que la comprobación visual en el momento de la extirpación de la neoplasia. Por ello se utiliza todo un proceso intraoperatorio que tiene la finalidad de poder visionar el 100% de los márgenes tumorales al microscopio. Un gráfico que representa el área extirpada es necesario para orientar el tejido. En caso de encontrar células tumorales en los márgenes, el cirujano debe ser capaz de identificar donde y que distribución presentan para poder re-extirpar justo allí donde se encuentra el tumor remanente. Sería el inicio de la segunda etapa. Las etapas se sucederían hasta eliminar el tumor en su totalidad.¹⁰¹

Tiene unos porcentajes de curación del 99% para tumores primarios y 95% en recidivantes.¹⁰² Con unas tasas de recurrencia a los 5 años de un 1-3% para los CBCs primarios y entre 5-7% para CBCs recurrentes.¹⁰³

A continuación enumeramos sus principales indicaciones:⁹⁷

- Localización: párpados, orejas, nariz, labios, pliegue nasolabial, frente, cuero cabelludo y zonas de fusión de pliegues embrionarios.
- Subtipos histológicos: esclerosante, infiltrativo, micronodular.
- CBCs recurrentes.
- Tamaño superior 2 cm.
- Afectación perineural.
- Márgenes mal definidos en zona de riesgo.

La cirugía micrográfica de Mohs es un buen tratamiento para CBCs de alto riesgo y de los de bajo riesgo que son recurrentes, (Grado de recomendación: A, nivel de evidencia I).⁹⁵

A.1.9.2 Tratamientos No quirúrgicos

Crioterapia

Se trata de una congelación y descongelación de la piel que provoca una necrosis tisular. El tratamiento es mas eficaz cuando se realiza un curetaje previo y posteriormente dos ciclos de congelación-descongelación (10-20 sg) alcanzándose unas tasas de curación a los 3 meses de hasta un 97% en los CBCs de bajo riesgo.¹⁰⁴

Sin embargo presenta altas tasas de recurrencia desde 8 a 40%,¹⁰⁵ que disminuyen cuando la técnica la realiza un profesional experto.¹⁰⁶ Su uso es sencillo, rápido, con bajo coste y puede ser útil en pacientes en los que los riesgos de la cirugía sean más elevados que los beneficios o con comorbilidades importantes. El tamaño del CBC no debe de superar los 2 cm de diámetro.

También se ha publicado el uso de la crioterapia de manera coadyuvante a otros tratamientos como el imiquimod. Gaitanis *et al.*¹⁰⁷ combinan la aplicación de imiquimod tópico con dos ciclos de crioterapia en CBCs de alto riesgo obteniendo unas tasas de curación de hasta el 95% a los 18 meses de seguimiento.

Las guías clínicas consideran la crioterapia como un buen tratamiento para CBC de bajo riesgo, (Grado de recomendación: A, nivel de I- b).⁹⁵

Electrocoagulación y curetaje

Esta técnica consiste en la eliminación del tumor usando curetas de varios tamaños para reducir al mínimo su tamaño. Posteriormente la herida resultante se coagula, con el electrodo en contacto directo con el tejido. Se puede repetir la técnica, sin embargo no hay consenso sobre cual es el mejor protocolo.

Su uso se debe considerar únicamente en CBCs de bajo riesgo superficiales o nodulares. Además es fundamental que no haya folículos pilosos en la zona del tumor ya que el CBC tiende a crecer alrededor de los anejos lo que permitiría su persistencia. Al igual que la crioterapia, su principal desventaja es que no permite estudiar los márgenes y la histología del tumor, además requiere de anestesia local, es un

procedimiento cruento limitado a pequeñas áreas. No obstante, en manos expertas y realizando previamente un curetaje del tumor, en CBC de bajo riesgo el porcentaje de curaciones es de un 97%, disminuyendo si son de alto riesgo o recurrentes.¹⁰⁸

Las tasas de recurrencia global a 5 años para los tumores primarios tratados con esta técnica varían de 3,3% en los sitios de riesgo bajo a 18,8% en los de riesgo alto.^{109,110}

Aumentando el porcentaje de recidivas hasta el 60% en tumores recurrentes.¹⁰⁹

La electrocoagulación o el curetaje puede usarse para CBC de bajo riesgo, (Grado de recomendación: A, nivel de evidencia II-c).⁹⁵

Láser

El laser es una fuente de luz coherente que en este caso se puede utilizar para la destrucción del tumor. Se han empleado tanto láseres ablativos como no ablativos. Su uso está indicado en tumores de bajo riesgo. Un estudio destaca una tasa de recurrencia en los CBCs tratados con laser de Nd de 1,8% y con Nd YAG de 2.5% en los primeros doce meses.¹¹¹

Al igual que los tratamientos previos, su principal desventaja es la falta del estudio histológico del tumor y su mayor ventaja es el resultado estético. Las guías clínicas consideran la ablación con láser de dióxido de carbono como una técnica que puede ser eficaz en el tratamiento del CBC de bajo riesgo, (Grado de recomendación: C, nivel de evidencia III).

Terapia Fotodinámica

Consiste en la aplicación de una sustancia fotosensibilizante (FS), excitada por una luz de adecuada longitud de onda y que en presencia del oxígeno da lugar a la producción de especies reactivas del oxígeno que producen la destrucción tumoral. De este tratamiento se hablará en detalle en el capítulo siguiente.⁹⁵

Quimioterapia tópica: 5-Fluoruracilo

El 5-fluorouracilo (5-FU) es un antimetabolito. Su mecanismo de acción consiste en penetrar en la célula, donde posteriormente se ribosila y fosforila, de tal manera que el producto final de estas reacciones se asemeja a los nucleótidos naturales. Posteriormente, el 5-FU se une a la enzima timidilato sintasa, inhibiéndola y produciendo una depleción de timina, consecuentemente una disminución en la

síntesis de ADN y por tanto la muerte celular. Generalmente se usa en QAs, y menos son los estudios realizados en CBC.

El primer ensayo descrito aplicaban el 5-FU dos veces al día durante 11 semanas con un aclaramiento clínico del 90% a las 3 semanas de finalizar el tratamiento, pero no se realizó seguimiento clínico.¹¹²

Para un buen funcionamiento y adherencia al tratamiento se debe de advertir a los pacientes de la reacción inflamatoria local extensa que el tratamiento produce. Sobre el uso del 5-FU intralesional, Miller *et al.*¹¹³ compararon seis regimenes diferentes de 5-FU intralesional con gel de epinefrina. En todos los grupos del estudio se obtuvo un aclaramiento global histológico del 91%, (IC=95% 84-96) a los tres meses del tratamiento. Las guías clínicas consideran al 5-FU un tratamiento efectivo para el CBC superficial, (Grado de recomendación: A, nivel de evidencia I).⁹⁵

Inmunoterapia

Interferón (IFN)

Su mecanismo de acción se basa en la inducción de apoptosis en las células basales. El interferón estimula la síntesis de la interleuquina 2 (IL-2) e inhibe la IL-10 mediante su unión al receptor CD-95.

Su posología es de tres inyecciones a la semana durante tres semanas, si bien no se obtienen índices altos de curación. Cuando se combina IFN- α y γ intra y perilesionalmente en CBCs agresivos, extensos, recurrentes y resistentes a otros tratamientos, con una posología de 3 veces a la semana durante 3 semanas y con estudio histológico a los 3 meses, se obtienen tasas de respuesta completa en un 47% de los casos, parcial en un 40% y en un 13% ausencia de respuesta.¹¹⁴

Añadido a su alta tasa de recurrencia, debemos de tener en cuenta que es un tratamiento caro ya que el paciente puede requerir múltiples inyecciones, además de que entre sus efectos adversos puede provocar un cuadro pseudogripal.

Imiquimod

El imiquimod fue aprobado en 1997 para el tratamiento de condilomas acuminados, y en 1999. Beutner *et al.*¹¹⁵ publicaron su primera su utilización en CBC. En 2004 se

ampliaron sus indicaciones incluyendo el tratamiento del CBC superficial, utilizando el régimen de 5 veces por semana durante 6 semanas.

Imiquimod se utiliza en forma de crema al 5% en monodosis y pertenece al grupo de las imidazoquinolonas. En cuanto a su mecanismo de acción, es un agonista del receptor toll-like 7 (TLR-7) implicado fundamentalmente en la respuesta inmune innata:

- Induce la síntesis y liberación de citoquinas de células de Langerhans, monocitos, macrófagos y células dendríticas (IFN- α , TNF- α , e IL-1, 6, 8, 10 y 12).
- Estimula a las células NK (natural killer) y su efecto citotóxico.
- Estimula la producción de anticuerpos por parte de células plasmáticas.
- Disminuye la expresión de bcl-2 y por tanto incrementando la apoptosis.

El porcentaje de respuestas completas de CBCs superficiales tratados con imiquimod, oscila del 69 al 91%.¹¹⁶⁻¹²⁶

El imiquimod no está indicado en el CBC nodular pero existen evidencias científicas de su utilidad. Actualmente existen 11 estudios de su uso en CBCs nodulares con un total de 438 tumores en los que se obtienen tasas respuesta completa del 67,7% con seguimiento clínico de 6 meses y con bajo número de recidivas.^{95,124,127}

El tratamiento con imiquimod tópico es efectivo en el tratamiento del CBC tipo superficial, (Grado de recomendación A, nivel de evidencia I); y parece que puede tener un papel en el tratamiento del CBC nodular no recurrente, (Grado de recomendación C, nivel de evidencia I).⁹⁵

Radioterapia

El mecanismo por el cual las radiaciones ionizantes producen la muerte celular es mediante daño al ADN, y afectando mayoritariamente a las células tumorales de mayor actividad mitótica e indiferenciadas.¹²⁸ En una serie de 412 CBCs tratados con radioterapia (RT), las tasas de curación a los 5 años descritas fueron del 90,3%.¹²⁹

En un ensayo prospectivo, donde 93 pacientes con CBC fueron distribuidos en dos grupos al azar, uno recibió tratamiento con crioterapia y el otro con RT, la tasa de curación a los 2 años para el grupo de RT fue de 96%.¹³⁰

Sin embargo, si se compara cirugía vs. RT se observa que las tasas de recurrencia a largo plazo con cirugía son de 0,7% y con RT mucho mayores de 7,25%.¹³¹

Además de sus recidivas, otra desventaja es la falta de control de los márgenes quirúrgicos, que terminan dañándose, pero es una técnica útil en pacientes no candidatos a cirugía, especialmente aquellos por encima de los 70 años, o como terapia adyuvante en CBCs con invasión perineural.

La RT es un buen tratamiento para CBCs primarios y para CBCs recurrentes (con la excepción de recurrencia tras RT) (Grado de recomendación A, nivel de evidencia I).⁹⁵

Tratamiento del CBC metastásico o localmente avanzado mediante dianas moleculares

Vismodegib

Vismodegib (GDC-0449) ha sido el primer fármaco aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) desde enero del 2012 para el tratamiento del CBC localmente avanzado no tributario de cirugía o radioterapia y para CBC metastásico (Erivedge, Genentech, 2012). Es una molécula que pertenece a la familia de la 2-arilpiridina e inhibe la vía Hh al bloquear la activación de Smo.¹³²

Von Hoff *et al.*¹³³ realizaron un ensayo clínico en fase I destinado al estudio de su farmacocinética y la seguridad. En este ensayo se trataron 68 pacientes, 15 presentaban CBC localmente avanzado y 18 CBC metastásico. Vismodegib se administró a 3 dosis diferentes: 150 mg/día, 270 mg/día, y 540 mg/día. La duración media del tratamiento fue de 9,8 meses. La evaluación de la respuesta tumoral se llevó a cabo mediante los criterios de respuesta para tumores sólidos (RECIST) (versión 1.0). De los 18 pacientes con CBC metastásico, 9 obtuvieron respuesta parcial, 7 permanecieron con enfermedad estable y 2 avanzaron en su progresión tumoral. De los 15 pacientes con CBC localmente avanzado, 2 tuvieron respuesta completa, 7 respuesta parcial, 4 enfermedad estable y 2 pacientes presentaron progresión tumoral. La tasa global de respuesta entre los pacientes con CBC localmente avanzado y metastásico fue del 60% y 50%, respectivamente. Entre los efectos adversos que se notificaron con más frecuencia fueron espasmos musculares, disgeusia, anorexia y pérdida de peso, todos ellos de grado 2-3.¹³³

Un ensayo clínico en fase II a partir de cual se produjo la aprobación del fármaco por la FDA, fue el realizado por Sekulic *et al.* ¹³⁴ se valoró la eficacia de vismodegib 150 mg en 104 pacientes con CBC localmente avanzado o metastásico. Se obtuvieron 30,3% respuestas parciales en el grupo de los CBCs metastásicos y en el grupo de los CBCs localmente avanzados se obtuvieron 20,6% respuestas completas y 22,2% respuestas parciales con una tasa de respuesta global en este grupo de pacientes del 43%. ¹³⁴

Otro estudio en fase II realizado por Tang *et al.* ¹³⁵ se llevó a cabo en pacientes con síndrome de Gorlin, para valorar su eficacia en la prevención de la aparición de CBCs. Se les administró vismodegib 150 mg y placebo. De los 41 pacientes que se incluyeron en el estudio, 24 fueron tratados con vismodegib y el resto con placebo, en el grupo tratado con vismodegib se desarrollaron 0,07 CBCs nuevos por mes frente a los tratados con placebo que fue de 1,74 ($p < 0,001$).

A pesar de la buena respuesta inicial, los pacientes tratados con antagonistas de Smo han desarrollado con el tiempo la resistencia debido a mecanismos de compensación que se generan. Además, los antagonistas de Smo no son eficaces en tumores donde la hiperactivación de Hedgehog se debe a mutaciones de componentes de la ruta aguas abajo de Smo, o en caso de la vía de activación no canónica, por la que se activan los factores de transcripción de Gli independiente de Smo. Por todas estas razones, la investigación de los inhibidores de Hh que actúan aguas debajo de Smo se está convirtiendo en un área de intensa investigación. ¹³⁶

Ya se han estudiado nuevas moléculas, como GANT61, que bloquea la función Gli, aumentando en estos últimos años el abanico de posibilidades terapéuticas frente a los CBCs localmente avanzados y/o metastásicos. ¹³⁷

Las guías clínicas consideran a los inhibidores de Smo efectivos contra el CBC metastásico o localmente avanzado, (Grado de recomendación A, nivel de evidencia II-a). ⁹⁵

A.1.10 Evaluación y pronóstico

Como ya se ha comentado, el CBC por lo general tiene un crecimiento lento y una evolución crónica.

Entre los factores clínicos relacionados con las recidivas se incluyen: ¹³⁸

- Tamaño mayor de 2 cm de diámetro.

- Localización nasal, nasolabial, periorbitaria, en regiones de fusión embriológica por su tendencia a invadir en profundidad.
- Tiempo de evolución prolongado.
- Antecedentes de CCNM.

Entre los factores histológicos destacan:

- Invasión perineural.
- Márgenes quirúrgicos afectos.
- Ausencia de empalizada periférica.
- Pleomorfismo celular.
- Espesor tumoral alto.
- En cuanto a las variedades histológicas la variante infiltrativa es la más significativa, aunque hay estudios que la relacionan también con la variante micronodular y multifocal.¹³⁹

Las metástasis son excepcionales, con un rango de 0,01% hasta 1,9%, y se presentan en tumores de gran tamaño o ulcerados, especialmente metatípicos. El intervalo de aparición es de 9 a 11 años y una vez que se han producido las metástasis, la supervivencia a los 5 años es del 10%. Los lugares donde se localizan son los ganglios, el pulmón y los huesos, siendo la supervivencia media de unos 8 meses.¹⁴⁰

A.1.11 Seguimiento

Todo paciente que ha padecido un CBC, independientemente de su fototipo y de los factores desencadenantes, tiene un 28% de posibilidades de desarrollar un segundo CBC u otro cáncer cutáneo.¹³⁹ El metaanálisis realizado por Marcil *et al.*¹⁴¹ concluye que estos pacientes tienen un riesgo acumulativo de hasta un 44%.

En la actualidad no hay consenso oficial, ya sea en la frecuencia o duración total del seguimiento, de los pacientes que han desarrollado un CBC primario. Sin embargo, la vigilancia a largo plazo de los pacientes con este antecedente es aconsejable, al igual que la educación del paciente con respecto a las medidas de protección contra el sol y el autoexamen. Esto nos ayudará a disminuir el riesgo de la aparición de nuevas

lesiones primarias, así como para valorar el fracaso al tratamiento y la aparición de recidiva local.

En cuanto a la aparición de nuevas lesiones, la NCCN (*The National Comprehensive Cancer Network*) en 2011 observaron que el 30-50% de los pacientes con CCNM desarrollarían otro en los 5 años siguientes,¹⁴² además estos pacientes también tienen un mayor riesgo de desarrollar melanoma cutáneo y sugieren un examen cutáneo completo cada 6-12 mes de por vida.¹⁴³

La posibilidad de desarrollar otro CBC después de la aparición de un primer tumor ha sido estudiada por varios autores. McLoone *et al.*¹⁴⁴ vieron que los pacientes diagnosticados de CBC tenían un riesgo de 11,6% de desarrollar uno nuevo en el primer año y un riesgo del 6,3% en el segundo año.

En un metaanálisis de siete estudios informaron que el riesgo acumulado de desarrollar un segundo CBC oscilaba entre un 33% hasta un 70%, lo que representa un aumento de aproximadamente 10 veces más que la tasa esperada en una población control. Analizando estos resultados se veía que las tasas más altas (60-70%) procedían de estudios en los que se incluía grandes poblaciones de pacientes con al menos dos (a veces más) CBCs previos, lo que sugiere que a medida que el número de CBCs aumenta, también lo hace el riesgo de desarrollar más tumores.¹⁴¹

Además las tasas de recurrencia son más altas en las lesiones que ya han recurrido en el pasado. Como los CBCs son tumores de crecimiento lento, estos tumores recurrentes pueden tardar hasta 5 años en presentarse clínicamente. Incluso en aquellos de alto riesgo se ha demostrado que un 18% recurren mas tarde.¹⁴⁵

Otro estudio sobre diferentes modalidades de tratamientos del CBC demostró que menos de un tercio de todas las recurrencias se producía en el primer año tras el tratamiento, el 50% dentro de los 2 primeros años, y el 66% a los 3 años.¹⁰⁹

Por lo que debemos de seguir a estos pacientes durante los cinco primeros años y si se trata de tumores de alto riesgo este seguimiento debería de ampliarse.

A.2 TERAPIA FOTODINÁMICA

A.2.1 Concepto

Es una técnica usada en Dermatología principalmente para el tratamiento del CCNM y sus lesiones precursoras. Está basado en la fotooxidación de materiales biológicos en determinados tejidos dianas, inducida por un compuesto fotosensibilizante (FS) (fig. 12).

Consiste en la administración de un FS que se acumula selectivamente en las células malignas, premalignas o hiperproliferativas, que al ser iluminadas con una luz de adecuada longitud de onda y en dosis suficiente, inducen la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y otros radicales libres que provocan el daño tisular y la subsiguiente muerte celular.¹⁴⁶



Fig. 12 Interacción del FS, la luz y la formación de radicales libres de oxígeno con resultado final de muerte celular.

A.2.2 Historia de la terapia fotodinámica

La combinación de sustancias fotosensibilizantes, con la exposición a la luz, constituye uno de los tratamientos más antiguos en Dermatología. En la India y en el antiguo

Egipto, se ingería una planta rica en psoralenos, la *Ammi majus*, para el tratamiento del vitiligo, lepra y otras lesiones cutáneas.

En 1900 Germans Oscar Raab, un estudiante alemán de medicina, descubrió que la exposición *in vitro* de *Paramecium caudatum* a naranja de acridina junto con una luz inducía la muerte del microorganismo.¹⁴⁷

Cuatro años mas tarde, Von Tappeiner acuñó el termino de "fotodinámico" o reacción fotodinámica como aquella que necesitaba luz, una sustancia FS y oxígeno. En 1904 combinó una solución al 5% de eosina aplicada tópicamente y luz para tratar tumores cutáneos, condilomas y lupus cutáneo.

La era moderna de la TFD, comienza en 1960 cuando Lipson y su equipo estudian el uso de hematoporfirina (Hp) para la detección de tumores. En la década de los setenta, Diamond consigue destruir tumores en ratones de laboratorio con luz blanca tras la inyección de Hp. En 1978, Dougherty y su equipo presentaron numerosos estudios acerca de la aplicación de esta nueva técnica en el tratamiento de tumores cutáneos con Hp administrada por vía endovenosa como sustancia FS. La Hp parcialmente purificada dió como resultado la aparición del Photofrin® aprobado para su uso en el tratamiento de tumores gástricos, de esófago, pulmón, y vejiga.¹⁴⁸

Sin embargo, el inconveniente que presentaba el Photofrin® era que durante varios meses los pacientes tenían fotosensibilidad sistémica. Para evitar este efecto indeseado, Kennedy *et al.*¹⁴⁹ demostraron que utilizando un precursor de la Protoporfirina IX (PpIX), el ácido delta 5-aminolevulínico como profármaco, que a diferencia de las grandes moléculas de porfirinas incapaces de penetrar la piel, sí es capaz de atravesar fácilmente la capa córnea induciendo la producción intracelular de PpIX. Es a partir de entonces cuando comienza la TFD tópica, que utilizamos actualmente en Dermatología.

A.2.3 Fotosensibilizantes

Los FSs, son compuestos naturales o sintéticos que se acumulan selectivamente en determinadas células o tejidos, que se excitan al absorber fotones dando lugar a una reacción fotoquímica (principalmente de tipo II) con resultado de muerte celular.^{150,151}

Según Stapleton y Rodes las características que debe de reunir un buen FS son:¹⁵²

- Capacidad para localizarse específicamente en el tejido o células a tratar.

- Distribución homogénea en el tejido diana.
- Alta lipofilia para penetrar en las membranas biológicas.
- Vida media corta y rápida eliminación en los tejidos sanos.
- Espacio de tiempo lo más breve posible entre la administración y la acumulación máxima en la diana a tratar.
- Activación frente a longitudes de onda determinadas y penetración óptima en el tejido.
- Alto rendimiento en la producción de oxígeno reactivo monoatómico singlete ($^1\text{O}_2$) o, en general, de EROS.
- Ausencia de toxicidad en un ambiente oscuro.

La mayoría de los FSs utilizados en TFD presentan una estructura tetrapirrólica similar a la de la porfirina, con un cromóforo central y cadenas auxiliares y con un grado alto de conjugación aromática de dobles enlaces que permite la deslocalización de sus electrones, características moleculares necesarias para poder realizar los procesos fotoquímicos.

El primer FS utilizado en la TFD moderna fue la Hp, caracterizada por el físico alemán Friedrich Meyer-Betz a comienzos del siglo XX. Posteriormente a partir de este compuesto, Lipson *et al.*¹⁵³ sintetizaron el derivado hematoporfirínico (DHP). Dichos autores observaron que este compuesto se localizaba en tumores, emitiendo fluorescencia roja al ser excitado con luz ultravioleta, por lo que inicialmente lo propuso como método de diagnóstico.

Dougherty, en la década de los 70, descubrió que el DHP irradiado con luz roja inducía la regresión de tumores de mama en ratas y ratones. Posteriormente, analizó la estructura de la Hp, vió que la transformación de la Hp en DHP por acetilación, daba lugar a nuevas porfirinas y caracterizó el compuesto activo del DHP, formado por dos porfirinas unidas por un enlace éter.¹⁵⁴ La TFD recibió un mayor interés gracias al Dougherty, que ayudó a ampliar los ensayos clínicos y fundó en 1986, la Asociación Internacional Fotodinámica. Todos estos descubrimientos llevaron a la aprobación del Photofrin® en clínica para el tratamiento de cánceres humanos, en Canadá en 1993 (seguida de los EE.UU). El Photofrin®, es una mezcla purificada de oligómeros del

DHP (fig. 13), que ha resultado efectivo, pero presenta varios inconvenientes, incluyendo: tendencia a causar fotosensibilización cutánea prolongada, escasa absorbancia en la zona roja del espectro (630 nm) donde la penetración de la luz es mayor y una composición química poco definida, lo que dificulta la identificación de su mecanismo de actuación.¹⁵⁰

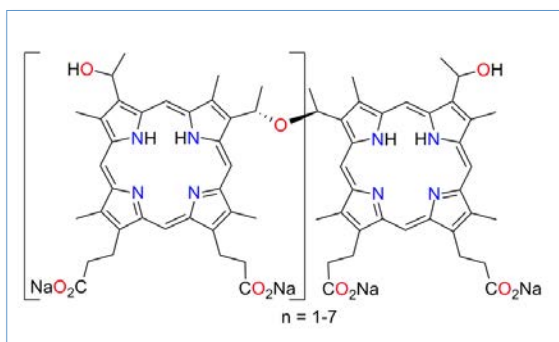


Fig. 13 Estructura química del porfímero sódico.

A partir de entonces, se han ido descubriendo numerosos FSs con menores efectos secundarios y mejores propiedades fotoquímicas y de localización tumoral como nuevos derivados de porfirinas, clorinas y ftalocianinas, entre otros. Además, el uso de transportadores como anticuerpos o nanopartículas favorecen la localización tumoral.

155

Asimismo, la combinación de varios FSs puede mejorar la eficacia de la TFD.¹⁵⁶

Dentro del campo de la TFD en oncología dermatológica, los principales compuestos que se emplean actualmente son el ácido-5-aminolevulínico (ALA) y su derivado metilado (MAL). Ambos son precursores del FS endógeno PpIX, metabolito de la ruta hemo. En condiciones fisiológicas normales, la síntesis del grupo hemo (fig. 14) se inicia por la síntesis de ALA a partir de glicina y succinil CoA, reacción catalizada por el enzima ALA sintetasa. A través de una serie de reacciones bioquímicas se origina el precursor PpIX que mediante la enzima ferroquelatasa, que cataliza la inserción del hierro en la PpIX, se origina el grupo hemo. Esta ruta metabólica está sujeta a un control feedback negativo, de manera que si se administra ALA o MAL exógenamente se acumula PpIX, que es un potente FS, en las células tumorales.

La formación de la PpIX tiene lugar en la mitocondria pero rápidamente difunde a otras membranas intracelulares, por lo que su localización varía con el tiempo de incubación. Así, en numerosos tipos celulares (como queratinocitos, fibroblastos, células de CEC o células de CBC), se ha observado que, tras tiempos cortos de incubación con ALA, la señal fluorescente correspondiente a la PpIX se sitúa en las mitocondrias, mientras que tras tiempos de incubación prolongados se visualiza en la membrana plasmática y en los lisosomas.^{157,158}

La PpIX presenta varios picos de absorción en el espectro visible, destacando el situado en la región del rojo del espectro a 630 nm. En la TFD con ALA o MAL, se usa generalmente luz roja para excitar al FS al ser lo suficientemente energética como para generar 1O_2 y presentar mayor capacidad de penetración en los tejidos biológicos que otras longitudes de onda más energéticas del espectro visible.^{150,159}

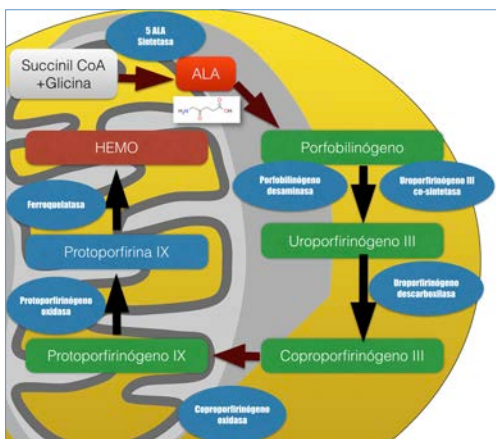


Fig. 14 Biosíntesis del grupo hemo. A partir de ALA, se forma PpIX (porfirina fotoactiva utilizada como FS en TFD) a través de una serie de reacciones enzimáticas que tienen lugar en la mitocondria y el citosol.

La utilización de ambos compuestos, ALA y MAL, está aprobada en EE.UU y Europa para el tratamiento de QAs, de Enfermedad de Bowen (EB) y ciertos tipos de CBCs.¹⁶⁰

A.2.3.1 Ácido 5 aminolevulínico (ALA)

Se trata de una aminocetona de 5 carbonos, es el primer compuesto intermedio en la síntesis de porfirinas (fig. 15). Se considera un FS de segunda generación precursor de las porfirinas.¹⁶¹

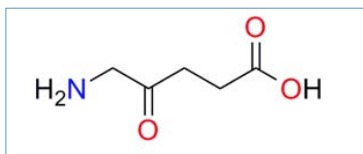


Fig. 15 Estructura química del Ácido aminolevulínico.

La primera publicación del uso de este profármaco en TFD fue de Kennedy *et al.*¹⁶² en 1990 al tratar 80 CBCs con éxito.

Entre sus propiedades químicas destacan que es hidrofílico por lo que son necesarias concentraciones altas y un mayor tiempo de incubación para que atraviese la capa córnea. Se introduce dentro de la célula a través de un transporte activo mediante transportadores de membrana de glicina y GABA.¹⁶³

A.2.3.2 Metilaminolevulínico (MAL)

Debido a que el ALA presenta una limitada capacidad de penetración en la piel por su carácter hidrofílico, se han sintetizado diversos derivados (metilo, pentilo, hexilo o bencilo), que muestran un carácter más lipófilo con una mayor capacidad de penetración en la célula.¹⁶³

Entre estos derivados destaca el MAL, que aporta mayor especificidad al tratamiento fotodinámico. Es un FS de segunda generación precursor de porfirinas, que tiene una característica física que lo diferencia del ALA y es que es más lipofílico y capaz de atravesar mediante transporte sin requerir energía (fig. 16). Por esto es más rápida y eficaz la absorción del MAL frente al ALA. Esta diferencia es aún más marcada en células malignas, obteniéndose así una localización más selectiva en el tejido tumoral.

Inmediatamente después de la entrada del MAL en la célula, este sufre una desmetilación que lo convierte en ALA, siguiendo los pasos de la síntesis del hemo igual que en el ALA descritos anteriormente.¹⁶⁴

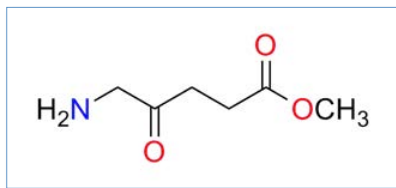


Fig. 16 Estructura química del MAL.

A.2.4 Fuentes de luz en Terapia Fotodinámica

El uso de una determinada fuente de luz en TFD viene determinado por el espectro de absorción del FS. Los requisitos que debe de cumplir dicha luz son:¹⁶¹

- Emisión en una longitud de onda que sea absorbida por el FS, con capacidad suficiente de penetrar en la piel y llegar al tejido diana.
- Adecuada fluencia y duración para que tenga lugar la reacción fotodinámica.
- Causar mínima molestia y eritema. No producir muchos efectos secundarios.
- Con la intensidad suficiente en poco tiempo.
- Que permita la irradiación de áreas pequeñas o grandes según se necesite.

A.2.4.1 Penetración de la luz en los tejidos

La adecuada penetración de la luz en el tejido depende de la longitud de onda de la luz. Así, longitudes de onda de 400 y 500 nm (Banda de Soret) alcanzan una profundidad es de 1-2 mm, las de 630 nm (la más usada en la práctica clínica habitual) la profundidad es de 5-10 mm, duplicándose en longitudes de onda de 700-850 nm (fig. 17).¹⁶⁵

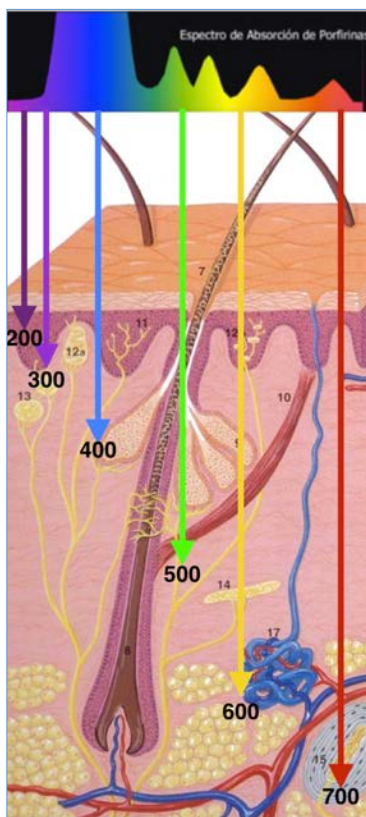


Fig. 17 Profundidad de penetración de las diferentes longitudes de onda (nm) en la piel, .

Por otro lado, la profundidad teórica de la luz disminuye debido a su absorción por los cromóforos naturales, de este modo por debajo de 600 nm es absorbida por la hemoglobina y la melanina. La melanina sobre todo absorbe longitudes de onda cortas, disminuyendo su absorción progresivamente hasta los 1.000 nm. La luz con longitudes de onda por encima de 1.300 nm es absorbida principalmente por el agua (fig. 18).

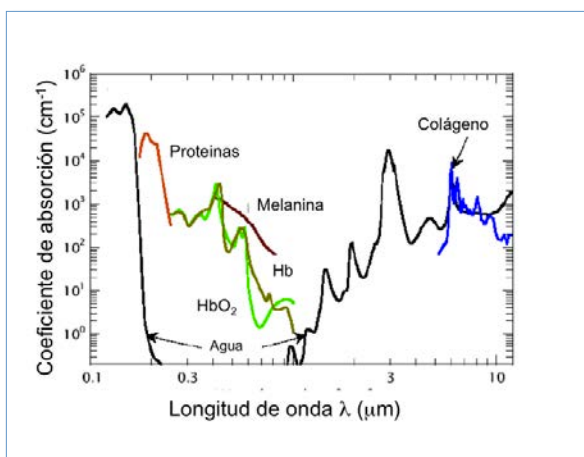


Fig. 18 Espectro de absorción de los cromóforos naturales.

Otro de los factores que hace que disminuya la penetración de la luz en los tejidos, es su alta dispersión en la piel así como la propia sustancia FS que al absorber la luz impide su penetración.

Las longitudes de onda cortas son más energéticas que las largas. Así, aquellas superiores a 850 nm no parecen útiles en la TFD ya que no son capaces de generar estados triplete suficientemente enérgicos para producir oxígeno singlete. Por todo lo explicado con anterioridad la ventana fotodinámica potencialmente más efectiva para tratar lesiones con cierta profundidad se considera entre los 600 y los 800 nm.

A.2.4.2 Dosimetría de la luz

La dosis fotodinámica es el producto de la concentración local de PpIX multiplicada por la fluencia de la luz (J/cm^2), asumiendo que existe una adecuada cantidad de oxígeno en los tejidos. Se estima que la intensidad de la luz necesaria para que ocurra la reacción fotodinámica, sin que suceda hipertermia excesiva que pueda inducir fenómenos de necrosis, es de $140\text{-}200 \text{ mW}/\text{cm}^2$.

La dosis de iluminación estándar con ALA o MAL, usando luz roja no coherente de 630 nm, es de $75\text{-}100 \text{ J}/\text{cm}^2$ y con lámparas de diodos emisores de luz (LED) es de $37 \text{ J}/\text{cm}^2$ para el MAL y de $75 \text{ J}/\text{cm}^2$ para el ALA.¹⁶¹

A.2.4.3 Tipos de fuentes de luz usadas en dermatología

En la TFD en Dermatología se usan tanto fuentes de luz no coherentes como láseres.

Fuentes de luz no coherentes

Fueron las primeras que se usaron en Dermatología. Entre sus ventajas destacan la capacidad de adaptarse a diversos FSs, debido a que pueden emitir diversas longitudes de onda, se puede tratar áreas extensas, son seguras, fáciles de manejar y más económicas que los láseres. Su principal desventaja es el efecto térmico ablativo significativo ya que, respecto al láser, estas luces presentan menor intensidad y mayor dificultad para controlar exactamente la dosis. Entre las usadas en Dermatología destacan: ¹⁶⁶

- Lámpara de filamento de tungsteno (Curelight[®]) con longitud de onda entre 570-710 nm.
- Lámparas de fluorescentes de luz azul (BLU-U[®] y ClearLight[®]) con longitud de onda de 417 nm y 405-420 nm respectivamente.
- Lámpara de haluro metálico a alta presión (Waldmann PDT 1200[®]) de longitud de onda entre 600-720 nm.
- Luz pulsada intensa (IPL) que emite entre 515 y 755 nm.
- Diodos emisores de luz (LED) (Akti-lite[®], BF-RhodoLED[®], Omnilux[®], Levuflash[®]), con un pico de emisión de 635 nm.
- Luz del día procedente del sol, dando origen a una modalidad denominada TFD con luz de día (TFD-LD) que cubre todas las longitudes de onda del espectro electromagnético.

Las luces incoherentes poseen las ventajas de permitir tratar áreas cutáneas más amplias y ser más baratas. Los diodos emisores de luz, pequeños semiconductores con una banda de longitud de onda estrecha de 20 a 50 nm y sin emisión de luz infrarroja, son una de las lámparas más utilizadas en TFD dermatológica en la actualidad.

Láseres ¹⁶¹

Los láseres permiten seleccionar con exactitud la longitud de onda correspondiente al pico de absorción del FS, así como la aplicación exacta de la luz en una pequeña área. Además, tienen una mayor irradiancia lo que permite acortar los tiempos de tratamiento. En general se usan los que emiten en color rojo a 630 nm (de vapor de cobre, ND-YAG o argón) o a 595 nm (láser de colorante pulsado).

El láser de colorante de argón emite una luz continua que puede ajustarse a las propiedades de absorción de distintos fotosensibilizantes (350-700 nm), por lo que es uno de los más utilizados en TFD.

Los láseres con longitud de onda a 595 nm, son muy selectivos con una alta intensidad y corto tiempo de tratamiento. Sin embargo entre sus inconvenientes destacan un manejo más difícil y un mayor coste.

Por el momento, no existe una única lámpara ideal y la elección de la fuente de luz se hace en función de la indicación clínica, número y tamaño de las lesiones a tratar, su portabilidad, flexibilidad, tiempo de tratamiento, coste, profundidad de la lesión y el pico de absorción del FS utilizado.

A.2.5 Fundamentos físico químicos de la TFD

El mecanismo de acción de la terapia fotodinámica radica en la interacción del FS con la luz y el oxígeno dando lugar a la formación de EROS inductoras de la muerte celular; una de sus principales ventajas es la elevada selectividad de los tratamientos esto es debido a la iluminación del área tumoral con luz de la longitud de onda adecuada a la naturaleza del fármaco FS para que éste se active, quedando el efecto terapéutico limitado a la región iluminada. ¹⁵⁰

A.2.5.1 Aspectos fotoquímicos

El principal evento en la TFD es la producción de EROS mediante procesos fotoquímicos. ¹⁶⁷

El FS absorbe luz (energía) que promueve el paso de un electrón a un orbital de mayor energía, estado electrónico excitado singlete (FS-singlete). Este estado electrónico excitado es efímero y tiende a liberar su exceso de energía mediante emisión de luz (fluorescencia) o calor (fototerapia).

Alternativamente puede convertirse, mediante un cambio en la orientación de su momento angular de espín, en un estado más excitado, estado triplete, más estable con mayor tiempo de vida y reactividad (fig. 19).

Existen dos tipos de reacciones fotodinámicas: ¹⁴⁶

Reacciones fotodinámicas de tipo I (mediada por transferencia de electrones): el FS en estado triplete interacciona directamente con dianas terapéuticas a su alcance, oxidándolas.

Reacciones fotodinámicas de tipo II (mediada por transferencia de energía al oxígeno): la interacción es con el oxígeno presente en el medio para formar principalmente oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). Esta molécula puede oxidar a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, etc. componentes que se encuentran en todas las células.

Tras estas reacciones el FS retorna a su estado basal no excitado.

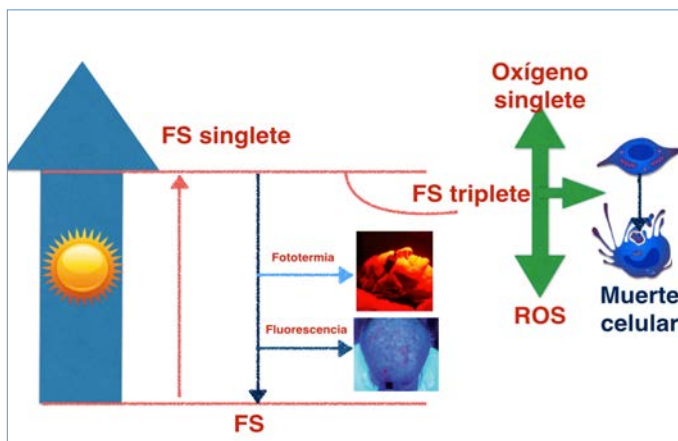


Fig. 19 Absorción de luz por un fotosensibilizador (FS) promueve el paso de un electrón a un orbital de mayor energía (FS-singlete) y a continuación éste cambia la orientación de su momento angular de espín (FS-triplete). Su mayor vida del estado electrónico triplete favorece la formación de radicales libres y/u oxígeno singlete que dañan estructuras claves de la célula y finalmente causan su muerte.

A.2.6 Respuesta biológica de la Terapia Fotodinámica

Los efectos antitumorales principales, tras la TFD, derivan de tres mecanismos principales.

A.2.6.1 Efectos citotóxicos directos de la TFD

Las dianas celulares más importantes de los FS son las mitocondrias, los lisosomas, la membrana plasmática y los elementos del citoesqueleto y condicionan, en gran medida, el tipo de muerte celular inducido. El radio de acción del $^1\text{O}_2$, es muy limitado, no excede las 0,02 μm , ya que su vida media es muy corta (de 1×10^{-7} s aproximadamente) por lo que el efecto citotóxico primario se relaciona con las dianas subcelulares del FS.^{150,168} Sin embargo durante la iluminación el FS se reubica afectando a otras estructuras celulares. El efecto citotóxico es debido a la acción citotóxica de las dianas primarias y de las secundarias.^{169,170}

Localización celular y dianas de la TFD

Uno de los eventos cruciales en la TFD es la captación del FS por parte de las células tumorales. Para poder observar la distribución intracelular se emplea la microscopía de fluorescencia, y en especial el láser confocal, la técnica con mayor sensibilidad y resolución espacial.^{169,171}

La captación y posterior localización intracelular depende de diversos factores como son:

- Del tipo de célula tumoral.
- Del propio FS: características estructurales, propiedades físico-químicas, concentración y tiempo de incubación, forma de vehiculización o vía de entrada en la célula. Los que mejor difunden a través de la membrana plasmática son los FSs hidrofóbicos y los que tienen dos o menos cargas negativas a diferencia de los FSs hidrofílicos y con más de dos cargas negativas que se incorporan al interior de la célula mediante mecanismos de endocitosis. Dentro de la célula, los FSs se pueden localizar en las diferentes estructuras celulares, como son las mitocondrias, los lisosomas, la membrana plasmática, el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y el citosol.^{169,172,173}

Es el destino subcelular de muchos FSs utilizados en TFD son las mitocondrias. Los FSs que se localizan en estas son aquellos con cargas catiónicas y los hidrofóbicos. En la tabla 3 se recogen las diferentes localizaciones subcelulares de diversos fotosensibilizantes.^{174,175}

Fotosensibilizante (FS)	Localización subcelular	Mecanismo de muerte celular
Caproniloxi-tetrakis metiloxetil porfenceno (CPO)	Retículo endoplasmático	Apoptosis y autofagia
Ftalocianina de aluminio (AlPcS₂₋₄)	Lisosomas	Indeterminado
Verteoporfín (benzoporfirina sintética)	Mitocondria	Apoptosis
Porfirinas catiónicas	Membrana plasmática y mitocondria	Necrosis y apoptosis
Zinc phthalocianinas (ZnPc)	Mitocondria	Apoptosis
Clorofilina e4	Mitocondria y Lisosomas	Apoptosis y autofagia
Hipericina	Retículo endoplasmático	Apoptosis y autofagia
Azul de metileno	Mitocondria y Lisosomas	Apoptosis
mTHPC (Foscan®)	Mitocondria, aparato de Golgi y Retículo endoplasmático	Apoptosis
N-aspartilclorina e₆ (Npe6)	Lisosomas	Apoptosis
Porfímero sódico (Photofrin®).	Membrana plasmática y mitocondria	Necrosis y apoptosis
Rosa de bengala	Aparato de Golgi	Necrosis, autofagia y apoptosis
Silicona naphthalocianina	Mitocondria, aparato de Golgi y Retículo endoplasmático	Apoptosis
Tetra-sodio-meso-tetrafenilporfina-sulfonato (TPPS₄)	Lisosomas	Apoptosis y autofagia

Tabla 3. Resumen de los principales fotosensibilizantes, su localización subcelular y el mecanismo de muerte celular generado.

Otras dianas de la TFD: el citoesqueleto y los complejos de adhesión celular.

Esta localización parece tener relación con los efectos ocasionados por la TFD en componentes del citoesqueleto, especialmente en los microtúbulos (MTs) y los microfilamentos de actina (MFs), y en estructuras de adhesión de distintas células tumorales.¹⁷⁶⁻¹⁷⁸

El citoesqueleto es una red proteica interconectada que juega un papel fundamental en la actividad biomecánica de la célula, a la que proporciona estabilidad estructural, soporte para el transporte de vesículas y macromoléculas, anclaje para receptores y canales iónicos, etc. Su relevancia en procesos relacionados con la progresión tumoral, tales como la motilidad y la división celular o el transporte vesicular, lo convierten, por tanto, en una diana fundamental de las terapias anticancerígenas, entre las que se incluye la TFD.^{179,180}

Uno de los efectos derivados del tratamiento fotodinámico, ampliamente documentado, es la desorganización del citoesqueleto, afectando tanto a los MFs como a la red microtubular que actúan en el mantenimiento de la estructura, la división y la migración, así como para el transporte intracelular.^{179,180}

Tanto la red microtubular interfásica como la de las células en división se ve alterada tras la TFD en diferentes tipos celulares y empleando diversas porfirinas (Photofrin®, Visudyne®), ftalocianinas (ZnPc, AlPc) y porfíricos (tetrafenilporfírico o TPPo y su derivado PdTPPo). Dichas alteraciones, en algunos casos, conducen a un bloqueo del ciclo celular en la transición de metafase a anafase, lo que parece estar relacionado con la muerte celular por catástrofe mitótica.

También se han descrito alteraciones en los MTs interfásicos tras el tratamiento fotodinámico mediado por ALA o MAL en células de glioblastoma y de carcinoma epidermoide, produciéndose la formación de *blebs* que contienen tubulina y acúmulos anormales de esta proteína en regiones perinucleares.^{176,178,181}

La TFD también incide sobre la maquinaria proteica encargada de regular la formación y reorganización de los MTs. En este sentido, el tratamiento fotodinámico con ALA altera la expresión de determinadas proteínas asociadas a microtúbulos (*Microtubule-Associated Proteins*, MAPs), relacionadas con los procesos de regulación de la polimerización de la tubulina, estabilización de MTs, control del transporte asociado a

MTs o unión de la red microtubular a los MFs y a determinadas proteínas de señalización.¹⁷⁸

Además, la TFD, induce la reorganización de proteínas de unión al citoesqueleto (como α -actinina o vinculina) e inhibe la actividad de proteínas como cofilina o septina, que origina la pérdida de arquitectura y la despolimerización de los MFs después del tratamiento. Todo esto contribuye a la inhibición de la migración celular y, en consecuencia, a la disminución de la potencial capacidad metastásica de las células tumorales.¹⁸²

Por otro lado, las células se adhieren entre ellas y a la matriz extracelular a través de moléculas de unión específicas, tales como las cadherinas y las integrinas. Estas proteínas funcionan también como receptores, desencadenando un gran número de señales intracelulares que regulan procesos relacionados con el desarrollo y la migración celular o la inflamación, entre otros.¹⁸³

En general, la TFD ocasiona una disminución de la adhesión de las células cancerígenas al sustrato. Esto se debe fundamentalmente a modificaciones ocasionadas por el tratamiento en la expresión de proteínas relacionadas con este tipo de adhesión, como las integrinas, la quinasa de adhesión focal (FAK), la α -actinina o la vinculina. También se ha descrito la subexpresión de genes que codifican para proteínas que conforman el complejo de adhesión célula-célula E-cadherina/ β -catenina. Ambos tipos de modificaciones parecen correlacionarse con la disminución de la supervivencia y de la capacidad metastásica de las células tumorales.^{178,184,185}

A.2.6.2 Efectos citotóxicos indirectos de la TFD

La TFD no solo ejerce un efecto directo sobre la destrucción de las células tumorales, además actúa sobre el estroma del tumor.¹⁸⁶

El estroma está compuesto por vasculatura, matriz extracelular y diferentes tipos celulares como las células endoteliales, los fibroblastos y las células del sistema inmune, incluyendo linfocitos y macrófagos que en conjunto regulan en gran medida el comportamiento de las células tumorales.

La vasculatura tumoral constituye la principal vía de diseminación de las células tumorales durante el proceso de metástasis a otros órganos diana. En este sentido, los FSs pueden acumularse en las células endoteliales de la microvasculatura del tumor y

ser activados con luz de longitud de onda apropiada. Esto, no solo ocasiona la muerte del tumor, sino que también promueve la liberación de determinadas sustancias, como los tromboxanos, que favorecen la agregación plaquetaria y la respuesta inflamatoria local, además de ejercer un efecto sobre el sistema inmune. Todo ello, conducirá a la obstrucción de los vasos sanguíneos, a la formación de trombos y a una situación de déficit de O₂ que tendrá como última consecuencia la destrucción de las células tumorales y la inhibición del crecimiento del tumor.¹⁸⁷

Así, el daño indirecto a la vasculatura tumoral contribuye al éxito de la TFD mediada por FSs como Photofrin® o Visudyne®. No obstante, se sabe que la hipoxia tumoral se encuentra asociada también con la progresión maligna y con la resistencia a quimioterapia y a radioterapia. Dado que la TFD es capaz de consumir rápidamente grandes cantidades de O₂, el tratamiento genera hipoxia, por lo que altos niveles de factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1) podrían estar asociados con una pobre respuesta a TFD.¹⁸⁶

La TFD puede inducir una respuesta inmune innata en el paciente tratado. Se ha descrito la activación del sistema del complemento, lo que da lugar a la liberación de ciertos mediadores secundarios, entre los que se incluyen citoquinas (IL-1 β , IL-6, IL-10), el factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), la quimioquina derivada de queratinocitos (KC), el factor de necrosis tumoral (TNF- α), el factor de crecimiento vascular (VEGF), cicloxigenasas (COX-2), prostaglandinas (PGE), histamina o algunos factores de coagulación. Todo ello conduce a una acumulación, en la zona tratada, de células inflamatorias (como granulocitos y macrófagos), responsables de la eliminación de las células necróticas y apoptóticas.^{150,188}

A.2.6.3 Muerte celular ocasionada por la TFD

La TFD genera una situación aguda de estrés en la célula que culmina con la muerte de la misma. Su clasificación puede realizarse atendiendo a diferentes criterios: morfológicos, bioquímicos, funcionales e inmunológicos. Según la clasificación propuesta por el Comité de Nomenclatura de Muerte Celular se distinguen los siguientes tipos de muerte celular: apoptosis (*tipo I*), autofagia (*tipo II*), necrosis (*tipo III*) y la asociada a la mitosis, conocida como catástrofe mitótica (*tipo IV*).^{189,190} La TFD puede desencadenar cualquiera de estos mecanismos de muerte dependiendo del tipo de FS y de su localización.

A.3 TFD EN EL CARCINOMA BASOCELULAR

La TFD con MAL se ha convertido en una técnica de indiscutible valor en el tratamiento del CBC y una alternativa terapéutica atractiva para determinados pacientes con contraindicaciones relativas a la cirugía.

El MAL es el único fotosensibilizante que tiene la indicación aprobada tanto en CBCs superficiales como en nodulares. El protocolo más recomendado es de 2 sesiones generalmente separadas por una semana.¹⁹¹

Kennedy y Pottier publicaron una serie de CBCs superficiales aplicando ALA y posteriormente iluminación a las 3-6 horas en la que obtuvieron un 79% de respuestas completas.¹⁴⁹ Christensen *et al.*¹⁹², realizaron el seguimiento de 53 CBCs de espesor < 3,5 mm tratados con ALA-TFD usando dimetilsulfóxido como potenciador de penetración; el 81% de los casos permanecieron libres de tumor a los 72 meses.

No obstante, la mayor parte de los estudios clínicos se han realizado con MAL. Dos estudios multicéntricos aleatorizados en los que aplicaron la TFD con MAL, mostraron tasas de respuesta del 92-97% de CBCs superficiales, con tasas de recurrencia del 9% al año.^{193,194}

En CBCs nodulares se han obtenido porcentajes de curación del 91% a los tres meses con una tasa de respuesta mantenida a los 5 años hasta del 76%.^{195,196}

Respecto a la respuesta histológica, dos estudios aleatorizados con MAL-TFD en CBCs nodulares en los que se les realizaba biopsia a los 6 meses en los respondedores mostraron una respuesta completa global del 73%. Esta cifra fue superior en las lesiones faciales, demostrándose su mayor eficacia con un 89% de respuesta histológica completa.¹⁹⁷

Se han realizado muchos estudios comparando la TFD a otras alternativas terapéuticas. Si se compara con la técnica *gold standar*, la cirugía, la tasa de respuesta completa de CBCs nodulares en el grupo de TFD con MAL y luz roja fue del 91% a los 3 meses, frente al 98% del grupo tratado con cirugía, con tasas de recurrencia a los 5 años del 14%, frente al 2% tras cirugía. En cuanto al resultado cosmético fue excelente en el 85% de los pacientes tratados con TFD frente al 19% de los tratados con cirugía.¹⁹⁵

En cuanto a la eficacia de la TFD con MAL frente a imiquimod y 5-FU, para el tratamiento de CBCs superficiales, Arits *et al.*¹⁹⁸ trataron 601 pacientes comprobando que con TFD con MAL a los tres meses tenían respuesta completa en un 84,2% de los casos y en el grupo de imiquimod era del 90% y en el de 5-FU del 87,9%.

También se ha comparado la TFD frente a crioterapia en CBCs superficiales, con porcentajes de curación de 78% y 80%, respectivamente, con mejores resultados cosméticos en el grupo de TFD.¹⁹³

El último metanálisis realizado y publicado recientemente por Wang *et al.*¹⁹⁹ fue diseñado para comparar la eficacia, la seguridad y el resultado cosmético frente a otros tratamientos para el CBC primario. En el se incluyeron ocho estudios con un total de 1.583 pacientes y concluyeron que la TFD es un método útil para el tratamiento del CBC, más eficiente que el placebo y con una eficiencia similar a la crioterapia y a los diferentes tratamientos farmacológicos (imiquimod tópico y 5-FU). Asimismo, comprobaron que aunque es menos eficaz que la escisión quirúrgica, tiene una importante ventaja frente a todos los procedimientos, que es la técnica más cosmética.

Existen predictores de mala respuesta. Fantini *et al.*²⁰⁰ comprobaron que el subtipo nodular y la localización en las extremidades lo eran tras la realización de un estudio multicéntrico de CBCs tratados con TFD con MAL, con una tasa de respuesta completa del 82% para CBCs superficiales pero solo del 33% de los subtipos nodulares se curaron, siguiendo el protocolo estándar.

Se han estudiado diferentes modalidades para mejorar la respuesta. La eliminación de costras e hiperqueratosis suprayacente y también el curetaje mejoran su eficacia ya que provocan una citorreducción tumoral.²⁰¹ Además, en casos tratados con TFD con ALA, la iluminación fraccionada usando dosis menores ha mejorado la capacidad de respuesta de los CBCs superficiales en comparación con la iluminación no fraccionada (aclaramiento de 97% vs. 89% a los 12 meses de la terapia).²⁰²

Entre las ventajas de la TFD destaca la utilidad en el Síndrome de Gorlin. En una cohorte de 33 pacientes con 138 lesiones tratados con TFD sistémica o tópica, según el grosor (mayor o menor de 2 mm de grosor medidos con ecografía respectivamente), se obtuvieron tasas de control local a los 12 meses del 56,3%.²⁰³

Otro grupo de riesgo en el que la TFD es útil es en el de los pacientes inmunodeprimidos (INMD).²⁰⁴ En una serie de 5 pacientes transplantados, con múltiples tumores en la cara, en total 32, se obtuvo remisión completa en un 75% de las lesiones.

Además, se ha estudiado la capacidad de la TFD de prevenir / retrasar nuevas lesiones en este grupo de pacientes. En pacientes INMD por trasplante renal una única sesión de TFD con MAL retrasaba la aparición de lesiones hasta 6,8 meses, comparándolo con el área contralateral no tratada.²⁰⁵

Otro beneficio de esta técnica es que mejora la satisfacción del paciente y reduce la necesidad de procedimientos quirúrgicos.²⁰⁶

También se ha comprobado que proporciona una mejor relación calidad-precio en comparación con el tratamiento quirúrgico del CBC a los cinco años.²⁰⁷

Su alta eficacia ha supuesto que en las últimas guías sobre el manejo de CBC, consideran a la TFD efectiva para el CBC superficial (Grado de recomendación A, nivel de evidencia I) y para el CBC nodular (Grado de recomendación B nivel de evidencia I).⁹⁵

A.4 LIMITACIONES DE LA TFD

Como ya hemos comentado la TFD es una técnica en la que los dermatólogos, en general, tienen mucha experiencia. Y a pesar de las numerosas ventajas ya indicadas presenta una serie de limitaciones. Como limitaciones están el dolor durante la iluminación, la capacidad de penetración tanto del FS como de la luz, y la posibilidad de aparición de resistencia, encontrándose ocasionalmente tumores refractarios al tratamiento.^{195,208}

A continuación se describen los factores más importantes que pueden limitar la respuesta de la TFD.

A.4.1 Dolor

Respecto al dolor, es la complicación más importante de la TFD y uno de los factores limitantes que puede impedir realizarla. Es provocado por la combinación de una

estimulación intensa de los nervios y la hipertermia. Un 60-80% de los pacientes tratados lo refieren como leve moderado y un 20% como intenso.²⁰⁹

La intensidad del dolor parece tener relación con el tipo tumoral; se ha observado que cuando se aplica a EB o CBC es menos dolorosa que si se realiza para QAs.²¹⁰

El dolor es dependiente también de la extensión de área a tratar y de la innervación de la zona. Asimismo, los pacientes con fototipos mas claros son más sensibles, y es más doloroso el segundo ciclo que el primer ciclo de TFD.²¹¹

A.4.2 Parámetros histológicos

A.4.2.1 Espesor tumoral

El factor limitante más estudiado es el grosor tumoral histológico, sobre todo en el tratamiento del CBC. Mc Kay *et al.* observaron que un tumor mayor de 0.4 mm tenía más posibilidades de recurrir.²¹² En este sentido, las guías terapéuticas recomiendan que la TFD es efectiva en CBCs nodulares menores de 2 mm de grosor.¹⁹¹ No obstante, el último estudio realizado por Roozeboom *et al.*²¹³ en CBC superficial, no encontró una asociación estadísticamente significativa entre el grosor, la extensión aneal y el fracaso del tratamiento, si bien ninguno de ellos presentaba un grosor superior a 1 mm.

Se han estudiado diferentes técnicas para evitar esta limitación de tamaño tumoral mediante el empleo previo de procedimientos que reducen la cantidad de tumor o que incrementan la penetración del FS. En este sentido, Christensen *et al.*²¹⁴ comprobaron que un curetaje profundo reducía en un 50% el grosor tumoral y mejoraba los resultados de la TFD en CBCs con un grosor medio de 2,3 mm, respuesta completa (RC) a los 3 meses del 93%.

También se ha empleado un *debulking* tumoral, la aplicación de dimetilsulfóxido y otras técnicas mas complejas como el láser Erbio YAG o de láser de CO₂ fraccionado previo para incrementar la eficacia de la TFD.²¹⁵

Otro parámetro histológico es el tipo tumoral comprobándose que los CBCs superficiales responden mejor que los nodulares, lo que corrobora lo anterior.²¹⁶

A.4.2.2 CBC pigmentados, morfeiformes, infiltrantes y ulcerados

Respecto a las otras variantes histológicas de los CBCs, los pigmentados son más difíciles de tratar ya que la melanina absorbe la luz, impidiendo su penetración y pudiendo dejar la parte inferior del tumor sin la suficiente luz para realizar la reacción fotodinámica, dando lugar a tumores persistentes.²¹⁶

La variante morfeiforme y la infiltrante, debido al aumento del colágeno y a los cordones de células que infiltran el tejido conectivo, es más resistente a la penetración del FS.²¹⁶

Otro factor que influye es la ulceración, comprobándose que puede ser un factor predictor negativo de la respuesta al igual que el tipo clínico nodular y el patrón infiltrativo.²⁰⁰

A.4.2.3 Hiperqueratosis

Se ha observado que uno de los principales inconvenientes para la penetración del FS es la hiperqueratosis. El pretratamiento de las lesiones con queratolíticos favorece que estas disminuyan su grosor, siendo más fácil retirar la queratina adherida y disminuyendo el sangrado que se produce durante la preparación.²¹⁷

A.4.3 Parámetros clínicos

A.4.3.1 Tamaño

Un parámetro sobre el que hay controversias es el tamaño. En el caso de CBC, Madan *et al.*²¹⁸ publicaron una serie de CBCs superficiales gigantes (> de 5 cm); de los 9 que trataron con TFD ninguno de ellos respondió y todos precisaron de cirugía. Fritsch *et al.*¹⁶⁶ observaron que un predictor negativo de respuesta a TFD era un diámetro superior a 4 cm. Del mismo grupo investigador valoraron este parámetro con la recurrencia observando una relación entre el tamaño y esta.²¹⁹

Tehranchinia *et al.*²²⁰ vieron que las lesiones grandes tenían una respuesta parcial disminuyendo su tamaño en más de un 80%, aunque se podía mejorar este resultado alcanzando una respuesta completa aplicando un mayor número de sesiones.

Sin embargo, existen más estudios que apoyan la hipótesis de que el diámetro tumoral no afecta la respuesta.^{194,196,200,221,222}

A.4.3.2 Localización

La localización de las lesiones puede tener una marcada influencia sobre la tasa de respuesta completa. Así, se ha observado que los CBCs localizados en cara o cuero cabelludo tienen tasas más bajas de RC en comparación con lesiones en el tronco o cuello (a los 24 meses, 54% vs. 88). Y dentro de la cara, la zona H limita su eficacia, demostrándose que, independientemente del tamaño, las tasas de RC son desfavorables. Si a esto le añadimos que se trata de una zona de riesgo, debemos de evitar la TFD en esta zona.²²¹

A.4.4 Variables clínicas del paciente

Otros factores que pueden limitar la eficacia son los relacionados con las variables epidemiológicas y clínicas de los pacientes. En cuanto a la edad, se ha comprobado que es más eficaz en personas jóvenes. Niessen *et al.*²²³ vieron que era debido a que la formación de PpIX tras la aplicación de MAL o de BF-200 ALA disminuye con la edad.

Una limitación que vamos a encontrar es en aquellos pacientes con fotosensibilidad cutánea, porfiria, alergia a las porfirinas y en pacientes con sensibilidad a cualquiera de los componentes de la formulación, en los cuales la realización de la TFD está contraindicada.

Por otro lado, el antecedente previo de radioterapia parece disminuir la tasa de RC a TFD, lo que puede ser debido a la mayor prevalencia de tipos nodulares y pigmentados en los CBCs inducidos por la radiación.²²⁰

A.4.5 Variables relacionadas con el profesional que realiza la TFD

Un factor poco estudiado pero muy importante que puede afectar a la respuesta a la TFD y por lo tanto constituir una limitación es la formación de los centros donde se realiza la TFD. Se ha visto que aquellos con experiencia tienen unas tasas más altas de RC frente a los que no tienen experiencia, en el caso de los CBCs de un 86% frente a un 69,2%.²¹⁶

A.4.6 Resistencias: variables Celulares y Moleculares

Uno de los principales retos que nos podemos encontrar es que las células tumorales no siempre responden al estrés oxidativo generado por el tratamiento, pudiendo sobrevivir al mismo. Las células supervivientes serían las responsables de recidivas que, eventualmente, podrían progresar a situaciones más agresivas. Los mecanismos celulares de resistencia al tratamiento fotodinámico no están definidos, por lo que profundizar en su conocimiento resulta de especial relevancia para poder optimizar la TFD, su aplicación en combinación con otras terapias y, por consiguiente, asegurar la erradicación del tumor.

Los mecanismos de mala respuesta a TFD serían, en principio, comunes a los inducidos por otras drogas utilizadas en el tratamiento del cáncer y estarían asociados a factores tanto extracelulares como intracelulares.

En cuanto a los factores extracelulares, estos están relacionados con la vasculatura y la matriz extracelular del tumor. La mayoría de los agentes quimioterapéuticos usados en clínica penetran en la célula por difusión pasiva. Así, cuanto mayor sea la concentración extracelular del fármaco, mayor será la cantidad que pasa al interior celular. Como se ha comentado con anterioridad, existen factores que pueden modificar la concentración extracelular del fármaco y dificultar la difusión del mismo, como la alteración de la vascularización tumoral o la presencia de determinadas moléculas (como el colágeno) en el tejido intersticial. De esta forma, al ser el daño a la vasculatura tumoral uno de los efectos inducidos por la TFD, la efectividad del tratamiento podría verse comprometida. Además, en esta situación, este daño a la vasculatura podría también promover la progresión y expansión de las células resistentes.^{186,224}

A nivel intracelular, puede deberse en parte, a la reducida acumulación de los fármacos en las células, al ser expulsados mediante determinadas proteínas transportadoras, principalmente la proteína Pgp (*P-glycoprotein*) y la proteína Mrp (*multidrug resistance-associated protein*).²²⁵ Asimismo, la falta de respuesta a TFD ocurriría a través de múltiples mecanismos, entre éstos se destaca la modificación de la expresión de determinados genes implicados en la génesis de la lesión oncológica; en el caso concreto del CCNM, se han descrito, en un 50-90% de los casos, mutaciones ocasionadas por la luz UV en el oncogén RAS y en el gen supresor de

tumores P53.²²⁶

Asimismo, en este mismo tipo de lesiones, se ha observado una sobreexpresión del gen que codifica para la proteína ciclina D1 y modificaciones en la expresión de genes implicados en la vía Wnt/ β -catenina, proteínas involucradas en los procesos de adhesión celular mediados por cadherinas (implicada en la progresión de QAs a CECs), y en la vía de Hh/PTCH.²²⁷

De la misma manera, el estrés oxidativo ocasionado por la TFD activa también la expresión de ciertos genes cuya actividad participa en la protección de la célula.^{186,224}

Así, se ha publicado sobre-activación de genes que codifican para proteínas como la COX-2, las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPKs), la proteína quinasa B (PKB), la fosfatidil inositol-3 quinasa (PI3K) y proteínas de choque térmico (HSP). En concreto, en lesiones epiteliales premalignas y malignas, se ha comprobado la activación de la proteína COX-2, que participa en la síntesis de prostaglandinas, implicada en procesos inflamatorios y la consecuente sobreexpresión de la PGE₂. La sobreexpresión de COX-2 y PGE₂ se considera parte de la respuesta temprana a la TFD y, por tanto, podría estar relacionada también con la mala respuesta al tratamiento.

Por su parte, las señales iniciadas por las MAPKs juegan un papel primordial en la modulación de numerosas respuestas celulares relacionadas con procesos de proliferación, muerte y supervivencia. La activación de estas vías de señalización se produce tras la unión de un ligando, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), a un receptor tirosina quinasa como el EGFR o el FGFR ambos implicados en la iniciación y la progresión de diversos tipos de cáncer. Se han descrito tres cascadas diferentes de señalización mediadas por MAPKs: la de las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), la de la quinasa p38 y la de las proteínas quinasas JNK, todas ellas relacionadas con procesos de proliferación, muerte y supervivencia celular. En general, se ha observado que, tras el tratamiento fotodinámico, tiene lugar la disminución de la expresión de EGFR, FGFR y otras proteínas participantes en las vías MAPKs, lo que estaría relacionado con la inhibición de la proliferación y la activación de mecanismos de muerte celular.^{228,229}

En resumen, estas vías descritas se ven sobre-activadas en una gran variedad de tumores, disparando cascadas de respuestas que modulan procesos que van desde el

crecimiento y la proliferación hasta la supervivencia y la motilidad celular, y que median también respuestas rápidas anti-apoptóticas, dando lugar a tumores resistentes que no responden a TFD.

B



JUSTIFICACIÓN

B. JUSTIFICACIÓN

La TFD es uno de los tratamientos no invasivos más usados en CCNM. Su uso está indicado en el CBC, tanto superficial como nodular, las QAs y la enfermedad de Bowen (EB) o carcinoma espinocelular in situ.²³⁰ Sus principales ventajas son dos:

- (1) las altas tasas de respuestas completas, a los tres meses, del 91% y a los 5 años del 76%, en los CBC.²³¹
- (2) la posibilidad de repetir el tratamiento cuando fuera necesario y/o combinarla con otras terapias,¹⁹⁵ todo ello con un excelente resultado cosmético y una gran satisfacción por parte del paciente.

Sin embargo tiene sus limitaciones, como el dolor durante la iluminación y lo que es más importante la capacidad de penetración del fotosensibilizante como de la luz, observándose que no es útil en lesiones profundas de más de 2 mm.

Aunque las tasas de respuesta a la TFD son altas en el caso de CBC nodulares y superficiales y en EB, existen algunos pacientes que no responden adecuadamente. Este problema ya fue descrito por Sieron *et al.*²³² y Perona y Sánchez²³³ en sus trabajos sobre aparición de resistencias a tratamientos oncológicos. Estas células neoplásicas gracias a sus mecanismos de supervivencia escapan de la muerte celular. Se han relacionado multitud de proteínas implicadas en este proceso: moléculas de adhesión celular, integrinas que intervienen en la interacción del citoesqueleto con la matriz extracelular, la supervivencia gracias a la activación de la vía PI3K/Akt, etc. Sin embargo no se conocen en profundidad las vías de escape y las diferencias biológicas entre los tumores que responden y los que no.²³⁴

El estudio de las diferencias clínicas, histológicas y biológicas de los CBC en su respuesta a la TFD nos ayudará a conocer mejor su mecanismo de acción, así como aumentar su eficacia y eficiencia permitiendo la selección de los pacientes con mayores probabilidades de respuesta a la misma.

Con la finalidad de ampliar nuestros conocimientos sobre los factores clínicos, histológicos, celulares y moleculares que influyen en la respuesta del carcinoma basocelular a la TFD ha surgido este trabajo de investigación que es objeto del presente proyecto de tesis doctoral.

C



HIPÓTESIS

C. HIPÓTESIS

Los carcinomas basocelulares resistentes a terapia fotodinámica poseen características biológicas diferentes a los carcinomas basocelulares que responden a TFD con MAL.

D



OBJETIVOS

D. OBJETIVOS

- 1) Analizar la tasa de respuesta a la TFD de los pacientes con CBC tratados en la Unidad de Dermatología del Hospital San Jorge de Huesca desde el año 2006 hasta el 2015.
- 2) Valorar las características de los pacientes (edad, sexo, fototipo, enfermedades concomitantes, inmunodepresión o número de sesiones recibidas) que pueden influir en la respuesta a la TFD.
- 3) Analizar la relación entre distintas variables clínicas tumorales de los CBCs (tamaño, localización, variedad clínica) y la respuesta a la TFD.
- 4) Analizar la asociación entre variables histológicas del tumor (tipo histológico, estroma peritumoral, pérdida de empalizada, pleomorfismo celular, elastosis, ulceración, invasión perineural, vascularización aumentada y presencia de infiltrado inflamatorio) de los CBCs y la respuesta a la TFD.
- 5) Determinar la relación entre distintas variables moleculares a través de marcadores inmunohistoquímicos en muestras de CBCs tratados con TFD o en líneas celulares que se relacionen bien con el pronóstico tumoral o con la fisiopatología del mismo y la respuesta a la TFD.

E



MATERIAL & MÉTODO

E.1 SELECCIÓN DE PACIENTES

E.1.1 Diseño

El trabajo está diseñado como un estudio observacional con recopilación de datos de forma retrospectiva en el que se han utilizado lesiones de pacientes compatibles con Carcinoma Basocelular que fueron tratados con TFD con MAL en la Unidad de Dermatología del Hospital San Jorge de Huesca desde el 1 de Enero de 2006 al 31 de Diciembre de 2015, cuyas muestras histológicas se conservan en los archivos del Servicio de Anatomía Patológica.

E.1.2 Criterios de inclusión

- Diagnóstico clínico y dermatoscópico de CBC superficial o nodular de cualquier tamaño y/o localización.
- Disponibilidad de la información clínica y/o patológica.

E.1.3 Criterios de exclusión

- Seguimiento clínico inferior a tres meses.
- CBC adenoide, morfeiforme o esclerodermiforme, micronodular, Infiltrativo, queratinizante, pigmentado, metatípico.
- Pacientes con diagnóstico de Síndrome de Gorlin.

E.2 TÉCNICA DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA

E.2.1 Material empleado para la realización de la técnica de TFD

CURETAS DÉRMICAS DESECHABLES.

FOTOSENSIBILIZANTE: empleamos como fotosensibilizador el Metvix[®], crema de metiléster-aminolevulinato en O/W a una concentración de 160 mg/g, comercializada por la compañía PhotoCure ASA (Oslo, Noruega) y siendo Galderma (Freiburg, Alemania) la responsable de su distribución por Europa.

APÓSITOS OCLUSIVOS (Tegaderm[®]) Y OPACOS (Mepore[®]).

ALCOHOL ISOPROPILO.

FUENTE DE LUZ: utilizamos una fuente de luz no coherente, compuesta por diodos emisores de luz, la lámpara usada ha sido Aktelite[®], CL 128 (128 diodos emisores de luz), 630nm, 37J/cm², 8min (Photocure, Oslo, Noruega).

FOTOPROTECCIÓN: empleo de máscara de fotoprotector FPS 50+ en crema, con filtros orgánicos e inorgánicos, como barrera protectora de luz solar y fuentes halógenas.

E.2.2 Realización de la técnica de TFD

Se preparó el área de tratamiento mediante una limpieza de la zona con alcohol isopropilo al 70% y se rasuró en caso de que se tratara de una zona pilosa.

Se realizó curetaje de las lesiones eliminando la hiperqueratosis o la parte sobreelevada del tumor (*debulking*), (fig. 20 A).

En algunos casos se tomó biopsia punch previa al tratamiento o bien se remitió el curetaje como espécimen para estudio histológico.

Se aplicó el Fotosensibilizante; se utilizó MAL en crema 160 mg/g (Metvix[®]) en el área a ser tratada, para lo cual se aplicó una capa con 1 mm de espesor alcanzando 1 cm de margen de piel sana. Posteriormente, se ocluyó la zona con un apósito tipo Tegaderm[®], para favorecer la penetración de la crema, y sobre él se aplicó un apósito opaco tipo Mepore[®], para impedir el paso de cualquier fuente de luz. Se establece un periodo de incubación del FS de 3 horas (fig. 20 B).



Fig. 20 A. Raspado de las lesiones mediante curetas desechables. B. Aplicación del MAL con oclusión durante tres horas.

Posteriormente se realizó un diagnóstico por fluorescencia, también llamado fotodiagnóstico; previamente se limpió la zona con suero fisiológico y se retiró la crema

y restos que existían. Con la luz de Wood se aprecia la fluorescencia clasificándola en fucsia / rosado más marcado / otros tipo de fluorescencia / o nada (fig. 21 A y B).

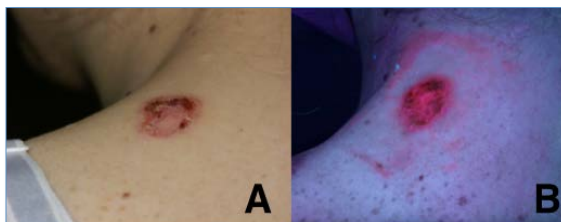


Fig. 21 A. Lesión tras desocluir el tegaderm® y el mepore®. B. Fotodiagnóstico positivo con fluorescencia fucsia.

Se procedió posteriormente a la administración de la fuente de luz, tanto el personal como el paciente previo a la iluminación se pusieron gafas de protección ocular. Se aplicó la fuente de luz, en este caso se utilizó la lámpara Aktelite®, empleándose los siguientes parámetros, fluencia de 37 J/cm², longitud de onda de 635 nm, colocando la lámpara a 5-8 cm, con un tiempo de iluminación de 7-9 minutos, (fig. 22).



Fig. 22 Aplicación de la fuente de luz. Se coloca la lámpara a 5-8 cm y al paciente se le ponen gafas opacas para evitar la fotosensibilidad ocular

Para el manejo del dolor se usaron diferentes medidas como la aplicación de spray con agua fría y en otros casos la medicación previa al tratamiento con analgésicos

convencionales como paracetamol, pirazonas o la inyección de anestésico de manera local o troncular siempre sin vasoconstrictor.

En el periodo postratamiento, se realizó limpieza del área del tratamiento, retirándose los restos de crema con agua termal o con suero fisiológico.

El área del tratamiento se protegió de las diferentes fuentes de luz, cubriéndola con un apósito opaco evitando la luz solar y luces halógenas, durante un periodo de 24 horas siguientes a la realización del tratamiento. Posteriormente, al paciente se le indicó la necesidad de aplicar fotoprotección solar (FPS 30 o más).

Al finalizar el tratamiento se valoró el nivel de dolor subjetivo experimentado durante el tratamiento mediante la EVA (escala visual analógica), del 0 al 10.

La pauta de tratamiento que hemos seguido ha sido la de aplicar 2 sesiones separadas por una semana.

Posteriormente se evaluaron los posibles efectos adversos locales, se exploró el área de tratamiento y la aparición de eritema, edema, descamación, púrpura, vesículas y costras (fig. 23).



Fig. 23 Diferentes efectos adversos observados tras la TFD. A- costras, B- habón, C- edema, D- púrpura.

La respuesta clínica se evaluó a los tres meses de finalizar el tratamiento. Valorándose si estaba curado o si por el contrario el tumor era resistente.

E.3 REVISIÓN DE DATOS

Una vez seleccionados los pacientes, se revisaron las historias clínicas de todos ellos y se recogieron los datos de interés que se detallan más adelante, así como su evolución. Las muestras fueron procesadas en los laboratorios de histología del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital San Jorge. Las muestras fueron fijadas en formol tamponado al 4% durante 24 horas y posteriormente se incluyeron en bloques de parafina para su procesamiento. Los tejidos fueron cortados en secciones histológicas con un espesor entre 4 y 5 μm utilizando un microtomo semiautomático de rotación de la marca comercial Micro. A continuación, las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina con un teñidor automático de la marca comercial Leica, modelo Autostainer XL (Nussloch, Alemania), siguiendo un protocolo estandarizado. Una vez desparafinadas en xilol se hidrataron en series decrecientes de etanol, se tiñeron con hematoxilina durante 2 min, se lavaron en agua corriente y se contratiñeron con eosina alcohólica durante 1 min. Finalmente, las secciones se deshidrataron, se aclararon en xilol y se montaron en definitivo con DePex.

Tras su tinción, las secciones de las lesiones fueron diagnosticadas por un dermatólogo y un patólogo con experiencia en dermatopatología.

E.4 ESTUDIO DE LAS VARIABLES

E.4.1 Variables clínicas

En el fichero de TFD de la Unidad de Dermatología del Hospital San Jorge se revisaron todas las fichas en las que su diagnóstico principal era CBC (Anexo I), excluyendo aquellos casos con diagnóstico de Síndrome de Gorlin. Posteriormente se pidieron al servicio de archivos del Hospital San Jorge las historias clínicas de los pacientes a los que correspondían estas lesiones previamente tratadas. De las historias clínicas de todos los pacientes se han recogido las siguientes variables (tabla 4).

Resistencias del Carcinoma Basocelular a la TFD con MAL

T. Gracia Cazaña

Variables Clínicas	Descripción
1 Fecha de nacimiento	(dd/mm/aaaa)
2 Fecha de diagnóstico	(dd/mm/aaaa)
3 Factores predisponentes	Sí (Transplante, radioterapia, VIH, INMD) / No
4 Sexo	Hombre/Mujer
5 Subtipo de CBC	CBC superficial vs. CBC nodular
6 Número de sesiones de TFD	(1, 2, 3, etc)
7 Tamaño tumoral	Mm
8 Localización	Cara (Área H vs. Área no H) / Cuero cabelludo / Extremidades / Tronco
9 Dosis de luz	Standard vs. Menos periodo de incubación y/o dosis vs. Mayor incubación y/o dosis
10 Resultado médico a los tres meses.	Curación / No curación / Mejoría
11 Repetición del tratamiento	Aquellos que han recidivado o bien a los tres meses no están curados y se les vuelve a dar sesiones de TFD: Sí, No
12 Seguimiento clínico	Valorar si existe recidiva tumoral: a los 6 meses, 12 meses, 18 meses, 2 años, 3 años, 42 meses, 4 años, 5 años, 6 años
13 Fototipo según la escala de Fitzpatrick	I, II, III, IV, V, VI

Resistencias del Carcinoma Basocelular a la TFD con MAL

T. Gracia Cazaña

14	<i>Fecha de la última revisión</i>	(dd/mm/aaaa)
15	<i>Tratamientos posteriores por recidiva o persistencia</i>	Cirugía / Radioterapia / Imiquimod al 5% / Criocirugía
16	<i>Resultado final</i>	Curado / No curado

Tabla 4. Descripción de las variables clínicas recogidas

E.4. Variables histológicas

Las variables histológicas recogidas se resumen en la tabla 5. Se revisaron aquellos que tenían biopsia previa y/o curetaje, siempre que hubiese material histológico suficiente, para poder llevar a cabo a posteriori diferentes tinciones inmunohistoquímicas.

Resistencias del Carcinoma Basocelular a la TFD con MAL

T. Gracia Cazaña

Variables histológicas	Descripción
1 Patrón histológico ⁸⁶	CBC: nodular / superficial.
2 Estroma peritumoral ²³⁵	<p>El estroma está compuesto por vasculatura, matriz extracelular y diferentes tipos celulares como las células endoteliales, los fibroblastos y las células del sistema inmune, incluyendo linfocitos y macrófagos. Tipos:</p> <p><u>Laxo</u>: hay cierto equilibrio entre sus constituyentes, pudiendo encontrarse todos los componentes celulares y extracelulares. Los fibroblastos son las células predominantes en este tejido. La matriz extracelular está conformada por fibras de colágeno, reticulares y elásticas.</p> <p><u>Denso</u>: en este tejido hay un predominio de las fibras y la sustancia fundamental amorfa sobre las células.</p> <p><u>Mucinoso</u>: tejido pobre en células y fibras y rico en sustancia fundamental amorfa basófila rica en ácido hialurónico.</p>
3 Pérdida de empalizada periférica	Células en la periferia de los agregados tumorales, que al menos focalmente, son columnares y ordenadas de tal forma que recuerdan a una empalizada. <u>Sí/No</u>
4 Pleomorfismo celular	Variabilidad en tamaño y forma de células y/o sus núcleos (anisocitosis, anisocariosis o anisonucleosis). <u>Sí/No</u>
5 Elastosis ²³⁶	Degeneración basófila del colágeno, fibras elásticas engrosadas, amorfas, de aspecto basofílico ubicada en dermis papilar y a veces en toda la dermis superior. <u>Sí/No</u>
6 Ulceración ²³⁷	La ulceración histológica solo se considera cuando existe una pérdida del espesor total de la epidermis. <u>Sí/No</u>
7 Invasión perineural ²³⁷	Presencia de carcinoma basocelular dentro del perineuro y o en el endoneuro. <u>Sí/No</u>

Resistencias del Carcinoma Basocelular a la TFD con MAL

T. Gracia Cazaña

8	Aumento de la vascularización	Un mayor número de vasos en periferia tumoral respecto a la piel sana peritumoral. <u>Sí/No</u>
9	Infiltrado inflamatorio	Presencia de linfocitos situados en la zona adyacente a la lesión tumoral para que se pueda definir la presencia de infiltrado linfocítico. Este infiltrado se ha clasificado en dos categorías: <u>Presente / Ausente</u>
10	Espesor tumoral²³⁸	Desde su definición por Breslow en 1970 para el melanoma, este parámetro ha permanecido inalterado a lo largo del tiempo. Es una medición cuantitativa del grado de invasión del tumor de la dermis que debe realizarse con un ocular con micrómetro calibrado. Mide el espesor, expresado en <u>milímetros</u> , desde la capa más superficial de la capa granulosa, en perpendicular desde la superficie epidérmica, hasta el punto más profundo de invasión de la masa tumoral en la dermis. En caso de que el tumor esté ulcerado se mide desde la base de la úlcera.

Tabla 5. Descripción de las variables histológicas recogidas.

E.4.3 Variables inmunohistoquímicas

El estudio inmunohistoquímico se realizó sobre cortes completos, con material suficiente. Para ello, se extrajeron los bloques de tejido del archivo de Anatomía Patológica del Hospital San Jorge. Se realizaron secciones con un espesor de 3 µm mediante el microtomo rotatorio, de bloques en parafina representativos de la lesión. Las secciones fueron colocadas sobre portaobjetos con capacidad adhesiva para técnicas de inmunohistoquímica (DAKO, Glostrup, Dinamarca).

Posteriormente, las muestras se calentaron durante 9 horas en una estufa seca a 56° para garantizar la adhesión del corte histológico, se desparafinaron durante 20 minutos en xilol, se rehidrataron utilizando una serie de alcoholes degradados y por último se lavaron con suero salino.

El desenmascaramiento antigénico se realizó al baño maría utilizando una solución tamponada a pH9 (Target Retrieval Solution, pH9, DAKO, Dinamarca). La solución tamponada se introdujo en jarras coplin. Se introdujeron las muestras en solución de desenmascaramiento una vez caliente durante 30 minutos. Posteriormente, las secciones se atemperaron durante 15-20 minutos, se aclararon en buffer durante 5 minutos y en agua destilada 5 minutos.

Tras esta preparación de las muestras, se programó el inmunoteñidor (Autostainer Plus, DAKO, Dinamarca), que sigue los siguientes pasos:

(1) Lavado con buffer; (2) bloqueo de peroxidasa endógena con bloqueante FLEX durante 5 minutos; (3) aclarado con buffer; (4) incubación con el anticuerpo primario según protocolo de cada anticuerpo (tabla 6); (5) aclarado con buffer; (6) incubación con el polímero marcado con peroxidasa (150 ml de FLEX/HRP en todos los anticuerpos), durante 20 minutos; (7) dos aclarados con buffer; (8) incubación con cromógeno (300 ml de FLEX DAB en todos los anticuerpos), durante 10 minutos. El producto de reacción de peroxidasa es revelado utilizando como sustrato 3,3'diaminobencidina (DAB), que al oxidarse, forma un producto marrón insoluble cuya precipitación interpretamos como positividad de la tinción; (9) aclarado con buffer; (10) contratinción con FLEX Hematoxilina, durante 5 minutos; (11) aclarado con buffer; (12) aclarado con agua destilada; (13) montaje de las preparaciones en gel que nos permitirá fijar el cubreobjetos (Dako Glycergel Mounting Medium; Dako, CA).

Resistencias del Carcinoma Basocelular a la TFD con MAL

T. Gracia Cazaña

Se estudiaron siete marcadores mediante inmunohistoquímica en los tumores incluidos en el estudio que fueron valorados con un microscopio óptico Nikon eclipse 50i (tabla 6).

Ac	Marca Comercial	Clon	Dilución	Ac monoclonal	Desenmascaramiento Antigénico	Tinción
Ki-67	Ventana Medical System	30-9	Prediluido	Conejo	Citrato CC1 pH:6	Nuclear
P53	Ventana Medical System	DO-7	Prediluido	Ratón	Citrato CC1 pH:6	Nuclear
CD-31	Cell Marque Corporation	JC70	Prediluido	Ratón	Citrato CC1 pH:6	Citoplasma y/o membrana
COX-2	Cell Marque Corporation	SP21	Prediluido	Conejo	Citrato CC1 pH:6	Citoplasma
EGFR	Ventana Medical System	3C6	Prediluido	Ratón	Citrato CC1 pH:6	Citoplasma y/o membrana
β-Catenina	BD Biosciences	610153	1/100	Ratón	Citrato CC1 pH:6	Citoplasma y/o núcleo y/o membrana
Survivina	Abcam	ab134170	1/400	Conejo	Citrato CC1 pH:6	Citoplasma y/o núcleo

Tabla 6. Anticuerpos monoclonales y clones, casa comercial, diluciones, protocolos de desenmascaramiento utilizados en el estudio y localización de la tinción.

Ki-67: la proteína Ki-67 es un marcador para la proliferación celular. Durante la interfase, el antígeno Ki-67 puede ser detectado exclusivamente en el núcleo de la célula, mientras que en la mitosis la mayor parte de la proteína se traslada a los cromosomas. La proteína Ki-67 está presente durante todas las fases activas del ciclo celular, pero está ausente en las células en reposo. Para el control interno de la técnica se ha utilizado la expresión aislada fisiológica de los queratinocitos basales de la epidermis. La valoración de Ki-67 se valoró como el porcentaje de células con

positividad nuclear en relación al total de células tumorales. De forma complementaria se valoró la intensidad la expresión en dos categorías: 1, presencia de tinción (tabla 7); 2, ausencia de inmunorreactividad.^{37,38}

P53: se considera que la inactivación mutacional de la proteína P53 sea una de las primeras aberraciones fundamentales en el proceso de carcinogénesis cutáneo. Su patrón de tinción es nuclear. Para el control interno de la técnica se ha utilizado la expresión aislada fisiológica de los queratinocitos basales de la epidermis.^{41,42} La valoración de P53 se ha estimado como el porcentaje de células con positividad nuclear en relación al total de células tumorales. De forma complementaria se ha valorado la expresión en dos categorías: 1, presencia de tinción; 2, ausencia de tinción (tabla 7).

Valor / intensidad	P53 y Ki-67
Localización	Núcleo
Inmunorreactividad	Presencia / Ausencia
Recuento del número de núcleos inmunoreactivos	%

Tabla 7. Características y valoración de la inmunotinción de P53 y Ki-67.

CD-31: El CD-31, también conocido como PECAM-1 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule*) es una proteína transmembrana monocatenaria tipo 1 con un peso molecular de aproximadamente 135 kDa, que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Entre sus funciones destacan: la participación de la migración de los leucocitos, la angiogénesis y la activación de integrinas.^{239,240}

Las células endoteliales marcadas por el anticuerpo muestran predominantemente una tinción de membrana, con tinción citoplasmática más débil. Para la valoración se ha localizado el área con mayor inmunoexpresión de vasos en relación con el tumor ("hot spot") y se ha cuantificado el número de vasos en un campo de gran aumento (x400).

Ciclooxigenasa 2: La ciclooxigenasa (COX) es un enzima que permite al organismo sintetizar PGs a partir del ácido araquidónico de la membrana celular. La actividad de COX-2 y de la PGE₂, son reguladores positivos de la proliferación en células tumorales inhibiendo la apoptosis. La COX-2 es un marcador precoz de daño actínico

fundamentalmente por UVB. ⁵³ Para la valoración de su expresión en las células tumorales se ha identificado en todos los casos la inmunotinción de la epidermis. El patrón de tinción de este marcador es de membrana y se valoró la intensidad de la expresión en dos categorías: 0, ausencia de tinción; 1, presencia de tinción (tabla 8).

Valor / intensidad		COX-2
Localización		Citoplasma
Inmunorreactividad	0	Ausencia de inmunorreactividad
	1	Presencia de inmunorreactividad

Tabla 8. Características y valoración de la inmunotinción de COX-2.

EGFR: Las mutaciones que llevan a la sobre-expresión del EGFR (conocidas como regulación positiva) o la hiperactividad se han asociado con determinados tipos de cáncer, incluyendo el de pulmón y el glioblastoma multiforme. Las mutaciones, amplificaciones o falta de regulación del EGFR o miembros de la familia están implicados en el 30% de todos los cánceres epiteliales. ^{38,67}

Para la valoración de su expresión en las células tumorales se ha identificado en todos los casos la inmunotinción de la epidermis, con el fin de comprobar la especificidad de la tinción. El patrón de tinción de este marcador es de membrana y se valoró la intensidad de la expresión en tres categorías: 0, ausencia de tinción; 1, intensidad débil; 2, intensidad moderada-fuerte (tabla 9).

Valor / intensidad		EGFR
Localización		Membrana y/o citoplasmática
Inmunorreactividad	0	Ausencia de inmunorreactividad
	1	> 0-33% de células basales marcadas
	2	> 33% -100% de células basales marcadas

Tabla 9. Características y valoración de la inmunotinción de EGFR.

β -Catenina: la alteración en su expresión tiene un papel importante en la proliferación ilimitada y la capacidad para invadir otros tejidos.²⁴¹ El patrón de tinción de este marcador puede ser de membrana o nuclear, por lo que se valoró que estructura celular teñía: citoplasma / núcleo y la intensidad de la expresión en tres categorías: 0, ausencia de tinción; 1, intensidad débil; 2, intensidad moderada-fuerte. Además en las muestras positivas se valoró el patrón de tinción: presencia de refuerzo de las células periféricas de los islotes o ausencia (tabla 10).

Valor / intensidad		β -Catenina
Localización		Nuclear / Citoplasmática
Inmunorreactividad	0	Ausencia de inmunorreactividad
	1	> 0-33% de células basales marcadas
	2	> 33% -100% de células basales marcadas
Patrón de tinción		Presencia de refuerzo de las células periféricas de los islotes o ausencia.

Tabla 10. Características y valoración de la inmunotinción de β -Catenina.

Survivina: esta proteína es inhibidora de la apoptosis. Por lo que favorece su supervivencia y proliferación. La survivina se localiza tanto dentro como fuera de la célula. Dentro de la célula, se ha observado en el citoplasma, el núcleo y en la mitocondria.⁷¹ Además de valorar la localización subcelular de tinción de este inmunomarcador se valoró la intensidad de la expresión en tres categorías: 0, ausencia de tinción; 1, intensidad débil; 2, intensidad moderada-fuerte (tabla 11).

Resistencias del Carcinoma Basocelular a la TFD con MAL

T. Gracia Cazaña

Valor / intensidad		Survivina
Localización		Nuclear / Citoplasmática
Inmunorreactividad	0	Ausencia de inmunorreactividad
	1	> 0-33% de células basales marcadas
	2	> 33% -100% de células basales marcadas
Patrón de tinción		Focal / difuso

Tabla 11. Características y valoración de la inmunotinción de Survivina.

E.5 ESTUDIO CELULAR

E.5.1 Línea celular

Este estudio se ha realizado empleando las líneas celulares de cáncer de CBC de ratón, ASZ y células BSZ.^{242,243} Ambas se aislaron de ratones heterocigotos para el gen *Ptch*+/- y las segundas carecen del gen P53. Ambos tipos celulares se cultivaron en medio de cultivo DMEM completo (Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco, Glucosa 1X, Gibco Invitrogen corp., Carlsbad, CA) suplementado con suero bovino fetal al 10% (v/v) (HyClone Laboratories, South América) y antibiótico al 1% (Penicilina 10.000 unidades/mL-estreptomicina 10.000 mg/mL, GibcoInvitrogen corp., Carlsbad, CA) en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% a 37 °C.

E.5.2 Tratamiento con TFD

Las células se incubaron durante 5 horas con 0,3 mM con MAL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en medio DMEM libre de suero. Posteriormente, se irradiaron empleando una fuente de luz monocromática (635 nm \pm 17 nm) con un sistema multi-LED con una intensidad de irradiación entre 0,45 J/cm² y 2,25 J/cm². Después de la irradiación, el medio DMEM libre de suero fue cambiado por medio DMEM completo.

E.5.3 Inmunofluorescencia Indirecta

Para la inmunodetección de P53 (Cell signaling Technology, Inc. Danvers, MA), las células se fijaron en formaldehído 3,7% (4° C) durante 30 minutos, se trataron con 0,1% de tritón X-100 en solución salina tamponada de fosfato, PBS durante 10 min. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo primario (dilución 1:100) durante 1 h a 37°C, se lavaron en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario (dilución 1:250) (Life technologiesTM, Eugene, Or, USA) durante 45 minutos a 37°C. Finalmente, todas las preparaciones se contrastaron y se montaron con ProLong[®] Gold con DAPI 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro (Life Technologies, Eugene, Or, USA).

E.5.4 Ensayo de migración celular

La migración celular se determinó mediante el ensayo de cicatrización de herida o *wound healing*. Se basa en el comportamiento de una monocapa confluyente de células a las que previamente se les ha realizado una "herida". Las células del borde de la "herida" se moverán para cerrarla. Se cultivaron 80.000 células de ASZ y BSZ en

la placa de cultivo utilizando injertos (Live Cell Culture Analysis, Ibidi®) durante 24 horas hasta que se formó una monocapa. Los injertos se retiraron para comenzar el ensayo. Las células se controlaron mediante fotografías a diferentes horas (5, 24, 30 y 48 h).

E.5.5 Ensayo de viabilidad celular (MTT)

La determinación de la viabilidad celular después de la aplicación del tratamiento fotodinámico se analizó mediante el ensayo MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio). Este ensayo colorimétrico consiste en la reducción metabólica de la MTT por enzimas mitocondriales, a formazán (púrpura). Las células se incubaron con MAL 0,3 mM durante 5 horas a 37 °C y después se irradiaron entre 0,45 J/cm² y 2,25 J/cm² utilizando una fuente de luz de 635 nm ± 17 nm. Las células a las que no se les aplicó fotosensibilizante ni luz se emplearon como controles y se expresaron como 100% de viabilidad. Las células con luz a 2,25 J/cm², pero sin fármaco se emplearon como controles de luz y las células con fármaco a 0,3 mM, pero sin luz se emplearon como controles de fármaco. Después de 24 h de tratamiento, las células se incubaron con MTT a una concentración final de 50 µg/ml durante 3 h a 37 °C. Posteriormente, el precipitado de formazán se disolvió con dimetilsulfóxido (DMSO, Panreac) y se realizó lectura de densidad óptica usando un SpectraFluor (Tecan) a una longitud de onda de 542 nm.

E.5.6 Análisis de las imágenes obtenidas de los cultivos celulares

Las imágenes microscópicas se obtuvieron utilizando un microscopio de epifluorescencia acoplado a una cámara CCD DP70 (Olympus BX-61) con filtros UV para la luz de excitación (filtro de excitación UG-1 360-370 nm), azul (filtro de excitación 450-490 nm BP 490), o verde (filtro de excitación de 570-590 nm 590 DM). El procesamiento de las imágenes fue realizado por Photoshop Extended CS5 12.0 (Adobe Systems Inc., Mountain View, CA, USA). El análisis cuantitativo de imágenes se realizó utilizando el software ImageJ 1.8 de dominio público (disponible en: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) (Wayne Rasband National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

E.6 ALMACENAMIENTO Y ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

E.6.1 Almacenamiento de datos

Los datos recogidos de todas las variables clínicas, anatómo-patológicas e inmunohistoquímicas se incluyeron en una base de datos construida sobre la aplicación informática Microsoft Excel, versión 2011 para Mac, definiendo en cada fila un caso y en cada columna una variable.

E.6.2 Análisis estadístico

El análisis estadístico se ha realizado con paquete estadístico SPSS® versión española 19.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

En primer lugar se efectuó un análisis descriptivo de los casos de las distintas variables:

- Variables clínicas
- Variables histopatológicas
- Variables inmunohistoquímicas

Las variables cualitativas se presentan como una distribución de frecuencias. Las variables cuantitativas se resumen en su media, desviación estándar (DE), o mediana y percentiles 25 y 75 según la distribución sea o no normal. Los gráficos asociados se decidieron según la tipología de la variable. En todos los casos se comprobó la distribución de la variable frente a los modelos teóricos.

La edad de los pacientes en el momento del inicio del tratamiento en años decimales se ha calculado según fórmula "Edad=CTIME.DAYS (Fecha inicio de tratamiento - fecha de nacimiento)/365.25.

La normalidad de la distribución de las variables cuantitativas fue valorada con el test Kolmogorov-Smirnov (considerando que los datos siguen una distribución normal si $p \geq 0.05$). Para valorar la asociación entre dos variables categóricas se ha utilizado el test χ^2 o Test Exacto de Fisher. Para valorar la asociación entre una variable binaria y una continua se ha empleado el test de Student para muestras independientes en el caso de que la variable seguía una distribución normal y U de Mann Whitney si la variable no seguía distribución normal. Para valorar la asociación de una variable

categorica con más de dos categorías, se ha aplicado la prueba de ANOVA de una vía o el test de Kruskal-Wallis según si la variable seguía o no la distribución normal. Se consideró existencia de significación estadística si $p < 0,05$.

Posteriormente, para determinar la influencia de las variables de estudio sobre la respuesta a TFD con MAL en el CBC se realizó un análisis de regresión logística, considerando como variable respuesta la curación (categorizada en sí/no) y como variables explicativas aquellas que resultaron significativas en el análisis univariante (clínicas, histológicas e inmunohistoquímicas). Para incluir las variables continuas se comprobó que seguían la distribución normal.

E.7 TRATAMIENTO DE LA BIBLIOGRAFÍA

Las fuentes bibliográficas se obtuvieron a través de los motores de búsqueda Pubmed (que accede a la base de datos MEDLINE y está disponible a través del enlace <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) y Google Scholar (<https://scholar.google.es>, un buscador de Google® diseñado específicamente para uso académico y científico).

La introducción de las citaciones en el texto se ha realizado mediante el programa gestor de referencias bibliográficas Mendeley® (versión 1.6) seleccionando el estilo American Medical Association de citación.

E.8 ASPECTOS ÉTICOS

El presente trabajo es un estudio de práctica clínica en el que no se ha alterado el manejo de los pacientes respecto de la práctica habitual. El protocolo ha sido aprobado por el Comité Ético de Ensayos Clínicos de Aragón (CP-CI PI12/0096) y forma parte de dos proyectos de investigación financiados por el Instituto de Salud Carlos III y Fondos FEDER (FIS: PI12/01253 y PI15/00974)

Todos los pacientes participantes fueron informados y dieron su consentimiento por escrito, antes de iniciar el tratamiento según el procedimiento clínico habitual.

F



RESULTADOS

F.1 VARIABLES CLÍNICAS

F.1.1 Características socio-demográficas y clínicas de los CBC incluidos en el estudio

Se incluyeron en el estudio un total de 390 Carcinomas Basocelulares en 182 pacientes, las **variantes clínicas** en las que se distribuyeron fueron: 278 nodular (71,3%) y 112 superficial (28,7%) (fig. 24). En cuanto a la distribución por **sexos**, 234 de los pacientes fueron hombres (60%) y 156 mujeres (40%) (fig. 25), con una media de **edad** de 72,82 años (DE=13) y un rango de edad de 38 a 100 años.

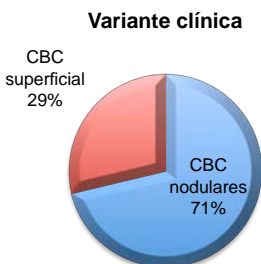


Fig. 24 Representación sectorial de los subtipos clínicos de los CBCs incluidos en el estudio.

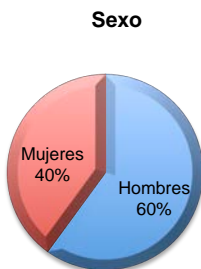


Fig. 25 Distribución por sexos de los casos de CBCs incluidos en el estudio.

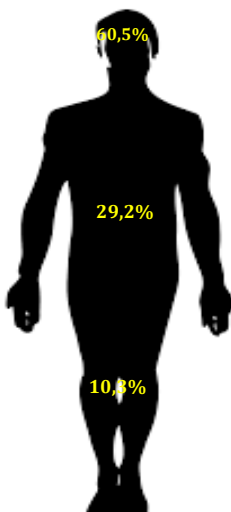


Fig. 26 Representación gráfica en el cuerpo humano de las localizaciones de los CBCs.

La **localización** más frecuente, fue la cabeza y el cuello en un 60,5%, hasta en un 45,4% (N=177) de los casos fue la cabeza y el cuello sin incluir el área H y 15,1% se localizaba en el área H (N=59), en el tronco se localizaba el 29,2% (N=114) y finalmente un 10,3% (N=40) se presentaron en extremidades, (fig. 26).

Respecto a los **factores predisponentes**, en la mayoría de los casos (N=360), no presentaban ninguna enfermedad predisponente (92,7%). El antecedente previo de radioterapia fue el factor predisponente más frecuente, en 28 casos (7,2%), además un paciente tenía antecedente previo de trasplante (0,3%) y otro inmunosupresión (0,3%) no debida a trasplante. Todos estos datos se resumen en la figura 27.

Resistencias del Carcinoma Basocelular a la TFD con MAL

T. Gracia Cazaña

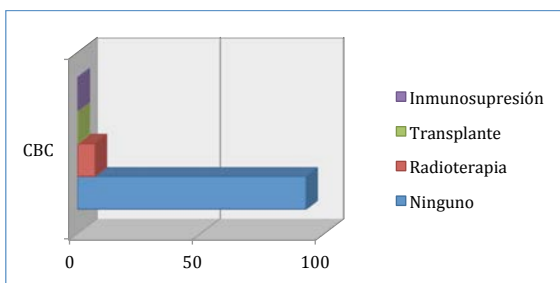


Fig. 27 Representación gráfica de los porcentajes de enfermedades predisponentes de los pacientes con CBCs tratados con TFD con MAL.

El **tamaño tumoral** medio de los CBCs fue de 10,42 mm (DE=7,75). Los datos se representan en la tabla 12.

	Media	DE	Rango	Mediana
Tamaño tumoral	10,42	7,75	1-50	10

Tabla 12. Media del tamaño tumoral con sus Desviaciones estándar, rango y mediana de la muestra de CBCs.

El **fototipo** se recogió en 70 CBCs; el fototipo I, II y III fueron los más frecuentes en un 78,6% de los casos (N=55), los fototipos más oscuros, IV-VI, solo se vieron en un 21,4% de los casos (N=15), tabla 13.

Fototipo	Fototipo I	Fototipo II	Fototipo III	Fototipo IV	Fototipo V	Fototipo VI
Quemaduras	Siempre	Muy fácilmente	Fácilmente	Ocasional	Raramente	Nunca
Bronceado	No	Mínimo	Gradual	Sí	Intenso	Máximo
% en CBC	← ← ←			← ← ←		

Tabla 13. Fototipos según la escala Fitzpatrick y los porcentajes obtenidos en los CBCs tratados con TFD.

F.1.2 Resultados de eficacia

Todos los casos recibieron la misma **fluencia** de luz (37 J/cm^2). El **número de sesiones** más frecuente que recibieron los CBCs fue de 2 , N=341 (87,4%) (fig. 28).

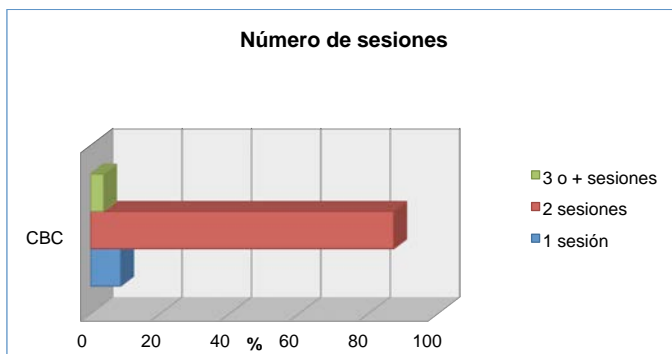


Fig. 28 Representación mediante diagrama de barras del número de sesiones que necesitaron los CBCs del estudio.

El **resultado médico**, evaluado a los tres meses, 335 CBCs respondieron (85,9%) frente a 55 que no lo hicieron (14,1%) (fig. 29).

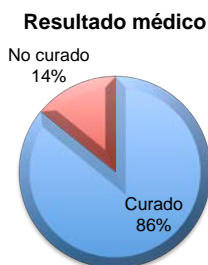


Fig. 29 Representación sectorial de la tasa de respuesta de la TFD evaluada a los tres meses en CBC nodular.

La **tasa de respuesta global** fue de 82,8%, con un **tiempo medio de seguimiento** de 35,96 meses (DE=23,46) con un mínimo de 3 meses y un máximo de 6 años.

F.1.3 Variables clínicas relacionadas con la TFD

En cuanto a las variables clínicas del CBC y su respuesta a TFD, se ha encontrado relación estadísticamente significativa con la edad, los pacientes que respondieron presentaban una media de edad inferior, 69,22 (DE=14,66), frente a los que no respondieron, 74,36 (DE=11,7) ($p=0,07$). El antecedente de receptor de trasplante como factor predisponente (aunque solo fue un solo caso), se asoció a peor respuesta al tratamiento ($p=0,025$). Respecto a la localización se encontraron tasas de respuesta inferiores en los localizados en el área H 62,7% frente al 94,7% de respuesta en tronco ($p=0,003$). Además existe una relación estadísticamente significativa entre la respuesta a TFD con MAL y el fototipo, con peor respuesta en fototipos oscuros (89,1%) frente a los más claros (66,7%) ($p=0,034$). Por último, los que recibieron más sesiones tuvieron porcentajes inferiores de curación, asociándose el número de sesiones a la respuesta a TFD ($p=0,001$).

La variante de CBC se relacionó con mayores tasas de respuesta entre los CBCs superficiales (93,8%) frente a los nodulares (78,4%) ($p < 0,001$). Sin embargo no se ha encontrado asociación de la respuesta con el tamaño ($p=0,445$) o el sexo ($p=0,742$). Todos estos datos se resumen en la tabla 14.

VARIABLES CLÍNICAS	Respondedores a MAL_TFD	No Respondedores a MAL_TFD	p
Edad	69,22 (DE=14,66)	74,36 (DE=11,7)	0,007
Tamaño*	10,29 (DE=7,87)	10,89 (DE=7,35)	0,445
Sexo			0,742
Hombres	195 (83,3%)	39 (16,7%)	
Mujeres	128 (82,1%)	28 (17,9%)	
Factores predisponentes			0,025
Ninguno	294 (81,7%)	66 (18,3%)	
Transplante	0 (0%)	1 (100%)	
Radioterapia	28 (100%)	0 (0%)	

Resistencias del Carcinoma Basocelular a la TFD con MAL

T. Gracia Cazaña

Immunosupresión	1 (100%)	0 (0%)	
Fototipo**			0,034
I, II, III	49 (89,1%)	6 (10,9%)	
IV, V, VI	10 (66,7%)	5 (33,3%)	
Desconocido	264	56	
Localización			0,003
Área H	37 (62,7%)	22 (37,3%)	
Resto de cabeza	148 (83,6%)	29 (16,4%)	
Tronco	108 (94,7%)	6 (5,3%)	
Extremidades	30 (75%)	10 (25%)	
Tipo tumoral			<0,001
CBC superficial	105 (93,8%)	7 (6,3%)	
CBC nodular	218 (78,4%)	60 (21,6%)	
(N) sesiones			0,001
1	33 (97,1%)	1 (2,9%)	
2	282 (82,7%)	59 (17,3%)	
3 o más	8 (53,3%)	7 (46,7%)	

Tabla 14. se recogen las diferentes variables clínicas estudiadas y su relación con la respuesta en CBC.

* El tamaño se recogió en 214 casos **Limitación: solo se recogió el tipo de fototipo en 70 CBCs.

F.2 VARIABLES HISTOLÓGICAS

Se evaluó la histología de 63 casos de CBCs tratados con TFD con MAL, de estos 49 muestras pertenecían a CBCs respondedores y 14 a especímenes de CBCs no respondedores.

F.2.1 Espesor tumoral

La media del espesor tumoral fue de 1,52 cm (DE=1,08), la mediana fue 1,3 cm y el rango de 0,2 cm a 4,7 cm (fig. 30). En el caso de los pacientes que respondieron la media fue 1,44 cm (DE=1,11) y en los no respondedores de 1,86 (DE=0,92) (p=0,081) (tabla 15).

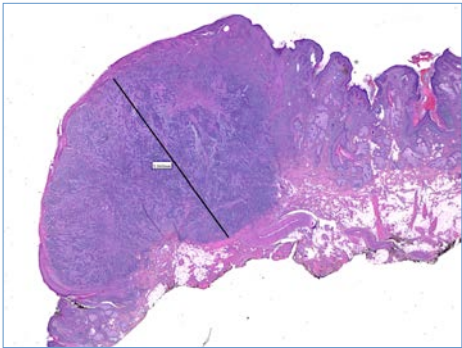


Fig. 30 Medida del espesor tumoral.

CBC	Respondedores MAL_TFD	a No Respondedores MAL_TFD	a p
Espesor tumoral			0,081
Media (DE)	1,44 (DE=1,11)	1,86 (DE=0,92)	

Tabla 15. Media del espesor tumoral en cada grupo de tumores (respondedores y no respondedores).

F.2.2 Tipo histológico

El patrón histológico más frecuente en los CBCs fue el nodular en 47 casos (74,6%), los restantes 16 CBC (25,4%) fueron diagnosticados de CBC variante superficial (fig. 31-33).

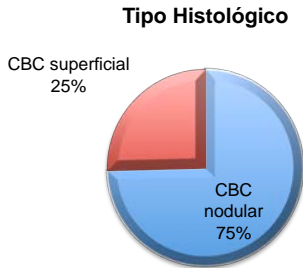


Fig. 31 Representación sectorial de las variables anato-mopatológicas incluidas en el estudio.

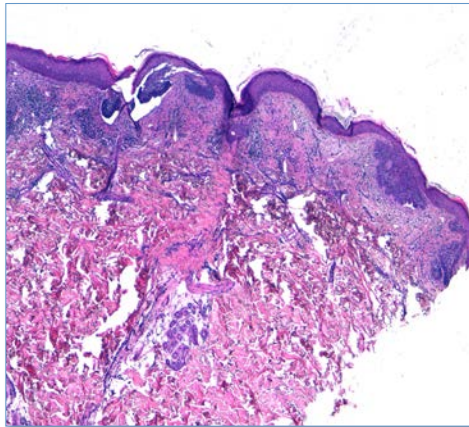


Fig. 32 Imagen histopatológica de CBC superficial (H&E x4).

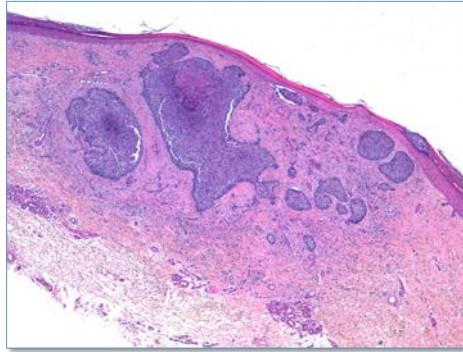


Fig. 33 Imagen histopatológica de CBC nodular (H&E x4).

Las tasas de respuesta en el grupo de los CBCs tipo superficial fue de 87,5% (N=14), este porcentaje fue menor en los CBCs nodulares 74,5% (N=35), sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas, ($p=0,487$) (tabla 16).

CBC	Respondedores a MAL_TFD	No Respondedores a MAL_TFD	p
Variante histológica			0,487
CBC superficial	14 (87,5%)	2 (12,5%)	
CBC nodular	35 (74,5%)	12 (25,5%)	

Tabla 16. Resumen de las variantes histológicas de los CBC y su relación con la respuesta a TFD con MAL.

F.2.3 Estroma peritumoral

El estroma más frecuente en los CBCs fue el denso en 36 casos (57,1%), seguido del estroma laxo en 26 casos (41,3%) y en solo uno (1,6%) se encontró mucina (fig. 34-36).

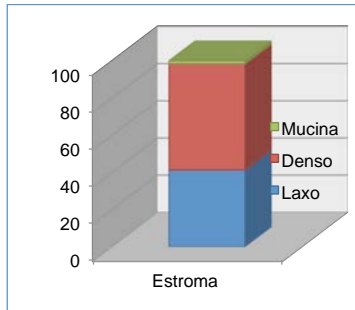


Fig. 34 Representación mediante diagrama de barras los porcentajes de los diferentes tipos de estromas.

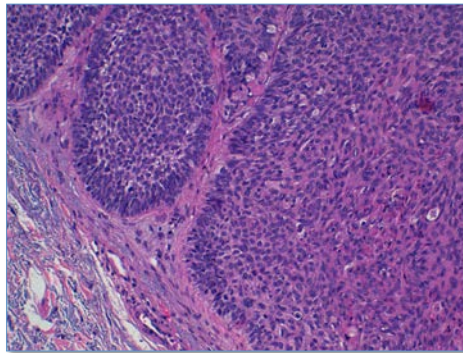


Fig. 35 Estroma peritumoral de tipo denso (H&E x20).

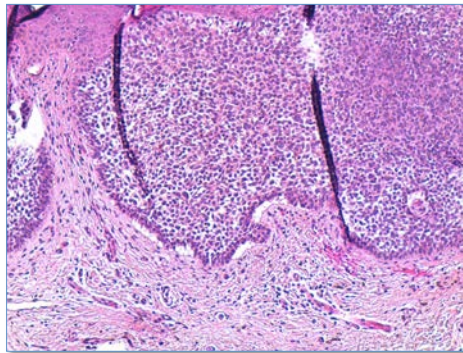


Fig. 36 Estroma peritumoral de tipo laxo (H&E x10).

Respecto a su asociación con la respuesta, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, obteniendo similares porcentajes de curación tanto en los CBCs con estroma denso como los que presentaban estroma laxo, 77,8% y 80,8% respectivamente ($p=0,369$) (tabla 17).

CBC	Respondedores a MAL_TFD	No Respondedores a MAL_TFD	p
Estroma			0,369
Laxo	21 (80,8%)	5 (19,2%)	
Denso	28 (77,8%)	8 (22,2%)	
Mucinoso	0 (0%)	1 (100,0%)	

Tabla 17. Tipo de estroma peritumoral y su relación con la respuesta a MAL-TFD en CBC

F.2.4 Pérdida de empalizada periférica

La pérdida de la disposición celular en empalizada (fig. 37), solo se observó en dos casos (3,2%).

Este hallazgo histológico en estos dos casos no se asoció a peor respuesta debido a que ambos respondieron a TFD con MAL (100%) ($p=1$) (tabla 18).

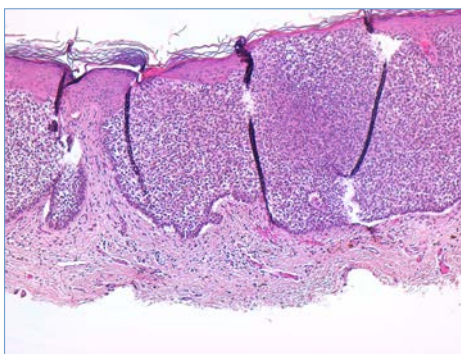


Fig. 37 Micrografía de las células basalioides dispuestas en la periferia a modo de empalizada (H&E x10).

Resistencias del Carcinoma Basocelular a la TFD con MAL

T. Gracia Cazaña

CBC	Respondedores a MAL_TFD	No Respondedores a MAL_TFD	p
<i>Pérdida de empalizada</i>			1
Sí	2 (100%)	0 (0%)	
No	47 (77%)	14 (23%)	

Tabla 18. Pérdida de empalizada y su relación con la respuesta a MAL-TFD en CBC.

F.2.5 Elastosis

El hallazgo histológico de elastosis se observó en 23 casos (37,7%), dentro de estos 18 respondieron a TFD (78,3%). En 38 casos no se halló elastosis (62,3%); de estos 38 casos, 29 se curaron con TFD (76,3%). No obstante, la presencia o la ausencia de elastosis no se relacionó con la respuesta (fig. 38 y 39) (tabla 19).

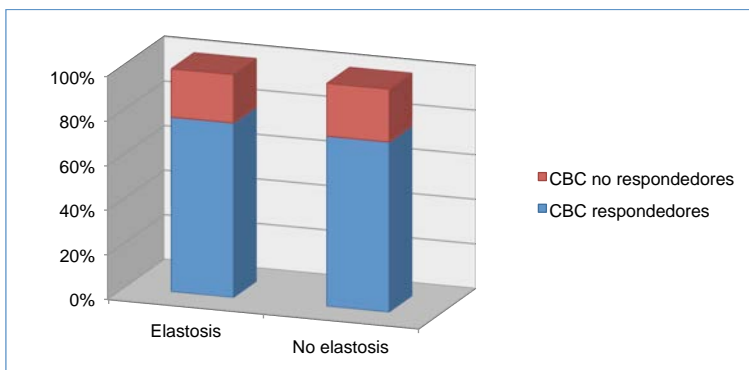


Fig. 38 Representación en diagrama de barras de la frecuencia de elastosis en los CBC respondedores y no respondedores a TFD con MAL.

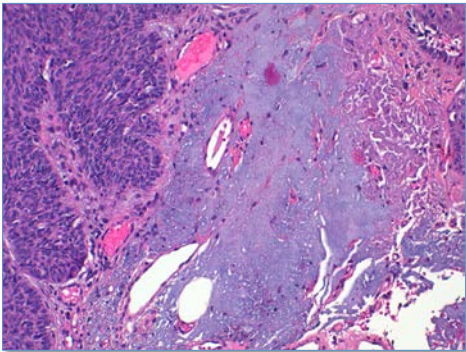


Fig. 39 En la dermis se evidencia elastosis solar, en contacto con los islotes de células tumorales (H&E x10).

CBC	Respondedores a MAL_TFD	No Respondedores a MAL_TFD	p
Elastosis			0,861
Sí	18 (78,3%)	5 (21,7%)	
No	29 (76,3%)	9 (23,7%)	
Desconocido	2		

Tabla 19. Descripción de los porcentajes de respuesta en presencia o no de elastosis en CBC .

F.2.6 Pleomorfismo celular e invasión perineural

La variabilidad en tamaño y forma de células y/o núcleos, no se observó en ningún caso de los estudiados (0%) (fig. 40). Tampoco se observó en ninguna de las muestras de CBC la invasión por islotes de células basalioides del espacio perineural (fig. 41).

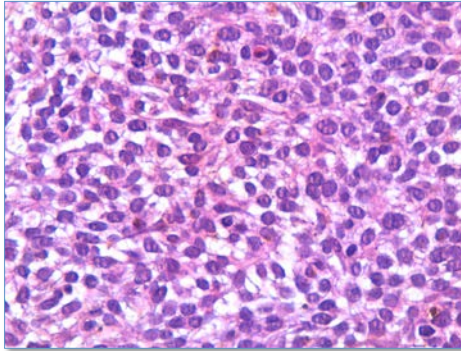


Fig. 40 Histología de las células basalioides donde se aprecian células monomorfas sin pleomorfismo celular (H&E x10).

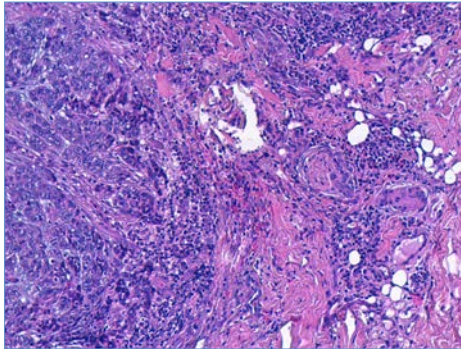


Fig. 41 Micrografía que demuestra la ausencia de invasión perineural (H&E x10).

F.2.7 Ulceración

La pérdida del espesor total de la epidermis (fig. 42), se observó en 16 casos de los 63 casos estudiados (25,4%), frente a 47 que no presentaron este hallazgo histológico (74,6%).

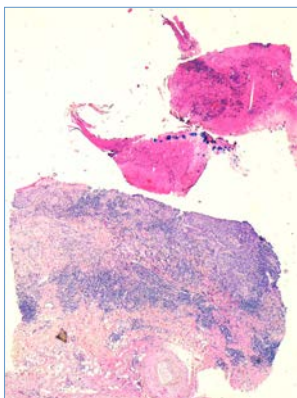


Fig. 42 Micrografía que demuestra la ulceración del CBC (H&E x5).

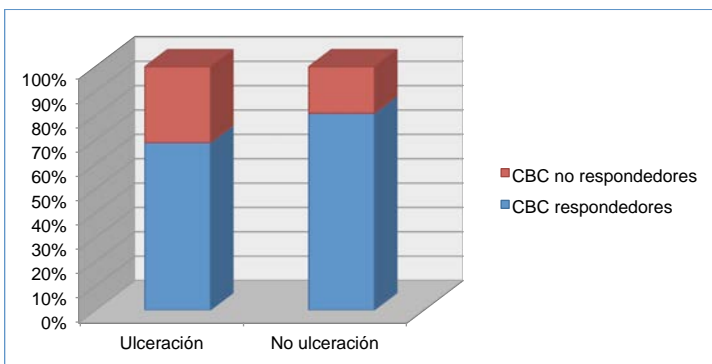


Fig. 43 Representación en diagrama de barras de la frecuencia de ulceración en los CBCs respondedores y no respondedores.

El 68,8% de los CBCs ulcerados respondieron a TFD con MAL frente a un 31,2% que no lo hicieron, los no ulcerados tuvieron tasas de curación mayor 80,9% sin ser estadísticamente significativo ($p=0,315$) (fig. 43) (tabla 20).

Resistencias del Carcinoma Basocelular a la TFD con MAL

T. Gracia Cazaña

CBC	Respondedores a MAL-TFD	No respondedores a MAL-TFD	p
Ulceración			0,315
Sí	11 (68,8%)	5 (31,2%)	
No	38 (80,9%)	9 (19,1%)	

Tabla 20. Resumen de los porcentajes de respuesta en presencia o no de ulceración en CBC.

F.2.8 Necrosis intratumoral

La necrosis de las células tumorales dentro del tumor (fig. 44), se observó en 11 CBCs (17,5%). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el hallazgo de necrosis intratumoral y la respuesta a TFD, 81,8% de respuesta en los que tenían necrosis frente a 76,9% en los tumores sin necrosis ($p=1$). Los resultados se muestran en la tabla 21 y se representan en la figura 45.

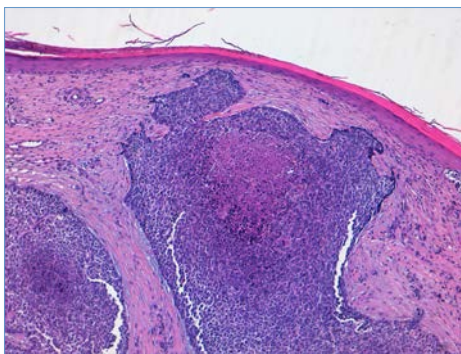


Fig. 44 Micrografía en la que se observa necrosis en el interior de los islotes de células basales (H&E x10).

Resistencias del Carcinoma Basocelular a la TFD con MAL

T. Gracia Cazaña

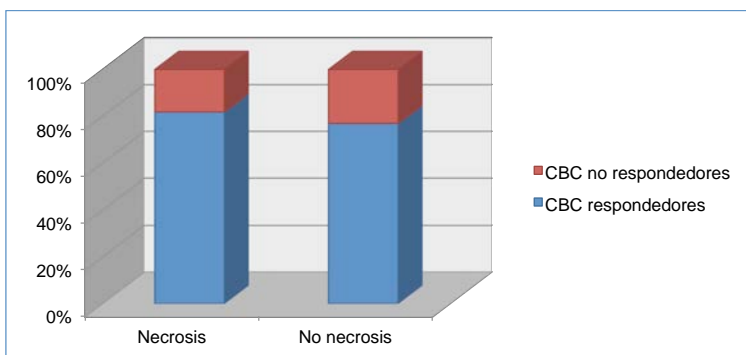


Fig. 45 Gráfico de barras que representa los porcentajes de necrosis intratumoral o no en CBC respondedores o no a TFD con MAL.

CBC	Respondedores a MAL-TFD	No respondedores a MAL-TFD	P
<i>Necrosis intratumoral</i>			1
Sí	9 (81,8%)	2 (18,2%)	
No	40 (76,9%)	12 (23,1%)	

Tabla 21. Resumen de los porcentajes de respuesta en presencia o no de necrosis intratumoral en CBC.

F.2.9 Aumento de la vascularización

El aumento de vascularización (fig. 46) en los CBCs se comprobó en 14 casos (22,2%) y no se relacionó con un cambio en la respuesta; los que presentaban en la histología mayor densidad de microvascularización tenían una curación del 85,7% frente a los que no tenían un aumento de la misma, cuya tasa de curación fue del 75,5%, ($p=0,716$) (fig. 47) (tabla 22).

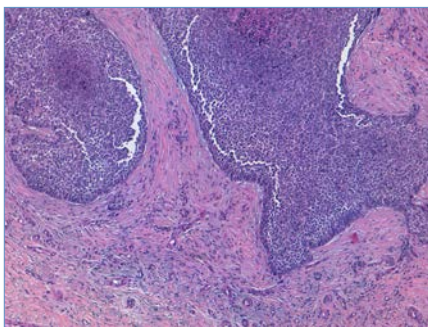


Fig. 46 Imagen anatomopatológica en la que se observa aumento de la densidad de microvasos en el estroma peritumoral (H&E x10).

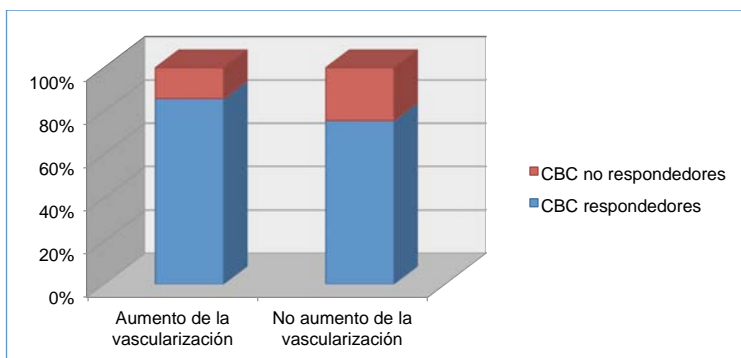


Fig. 47 Gráfico de barras que representa los porcentajes de respuesta de los CBCs en relación al aumento de la vascularización.

CBC	Respondedores a MAL-TFD	No respondedores a MAL-TFD	p
<i>Aumento de la vascularización</i>			0,716
Sí	12 (85,7%)	2 (14,3%)	
No	37 (75,5%)	12 (24,5%)	

Tabla 22. Resumen de los porcentajes de respuesta o no según el aumento de vascularización peritumoral.

F.2.10 Infiltrado inflamatorio

El aumento del infiltrado inflamatorio peritumoral se observó en 42 casos (66,7%) (fig. 48). En ellos se observó una mayor tasa de respuesta (85,7%) que en los CBCs que no presentaban inflamación peritumoral (61,9%), resultando estadísticamente significativo ($p=0,032$) (fig. 49) (tabla 23).

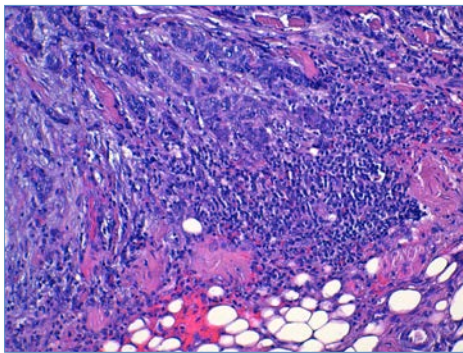


Fig. 48 Micrografía en la que se observa aumento del infiltrado inflamatorio linfocítico en el estroma peritumoral (H&E x20).

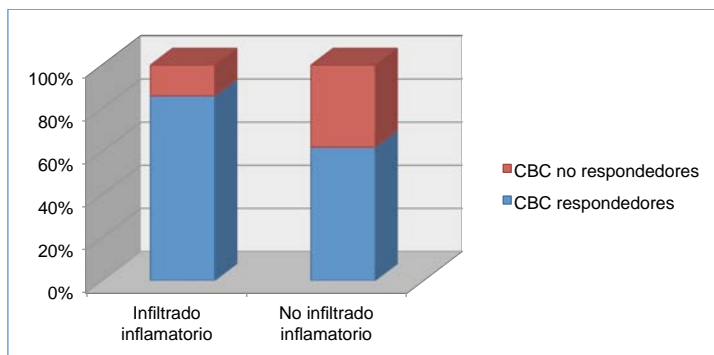


Fig. 49 Gráfico de barras que representa los porcentajes de respuesta en presencia o ausencia de inflamación peritumoral.

Resistencias del Carcinoma Basocelular a la TFD con MAL

T. Gracia Cazaña

CBC	Respondedores a MAL-TFD	No respondedores a MAL-TFD	p
<i>Presencia de infiltrado inflamatorio</i>			0,032
Sí	36 (85,7%)	6 (14,3%)	
No	13 (61,9%)	8 (38,1%)	

Tabla 23. Resumen de los porcentajes de respuesta en presencia o no de infiltrado inflamatorio en CBC.

F.3 VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS

F.3.1 Expresión de P53

La media del porcentaje de expresión de P53 en los pacientes que respondieron a TFD fue de 34,39 (DE=34,34), en el caso de los pacientes que no respondieron la media fue de 22,92 (DE=29,34) ($p=0,261$) (tabla 24). Si categorizamos la inmunotinción de p53 en positivo y negativo (fig. 50 y 51), un total de 52 casos fueron positivos (84,6%) y en 11 casos negativo (17,5%), teniendo mayores tasas de curación los CBCs con P53 positivo 84,6% (N=44), frente a los que fueron negativos 45,5% (N=5), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0,011$) (fig. 52) (tabla 24).

CBC	Respondedores a MAL-TFD	No respondedores a MAL-TFD	p
P53			0,011
Positivo	44 (84,6%)	8 (15,4%)	
Negativo	5 (45,5 %)	6 (54,5%)	
Media (DE)	34,39 (DE=34,34)	22,93 (DE=29,34)	0,261

Tabla 24. Resumen de los porcentajes de respuesta según la positividad de P53 y la media del porcentaje en cada grupo.

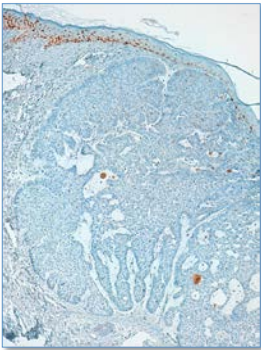


Fig. 50 Micrografía en la que no se observa inmunoreactividad para P53 en un CBC nodular no respondedor a TFD (P53 x10).

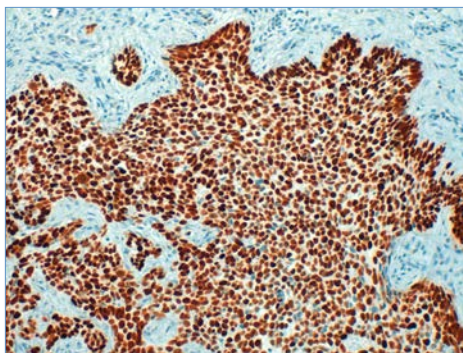


Fig 51 Micrografía que demuestra la positividad para P53 en un CBC nodular que respondió a TFD, con un 98% de sus células teñidas (P53 x40).

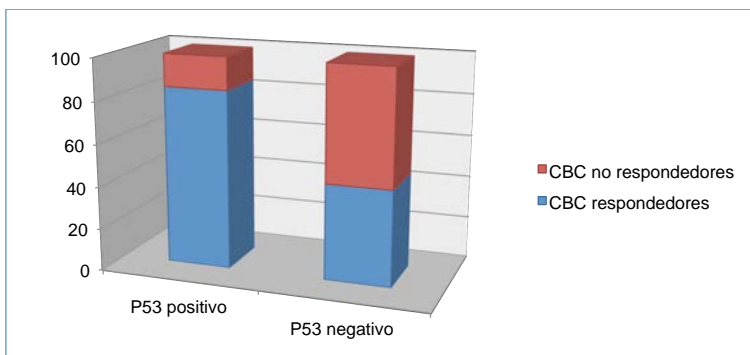


Fig. 52 Gráfico de barras que representa la tasa de respuesta en función de la positividad de P53.

F.3.2 Expresión de Ki-67

En los CBCs la media del porcentaje de expresión de Ki-67 en los pacientes que respondieron a TFD fue 31,71 (DE=22,41), en el caso de los pacientes que no respondieron la media fue 30,57 (DE=26,69) ($p=0,872$) (tabla 25).

Al clasificar la tinción en positiva o negativa (fig. 53 y 54), un total de 62 casos, casi la totalidad, 98,4% fueron positivos y tan solo un CBC tuvo inmunotinción negativa (1,6%). La tasa de respuesta en los CBCs que tenían Ki-67 positivo fue de 77,4% y el negativo respondió, este parámetro no se asoció a la respuesta ($p=1$) (tabla 26).

Resistencias del Carcinoma Basocelular a la TFD con MAL

T. Gracia Cazaña

CBC	Respondedores a MAL-TFD	a No respondedores a MAL-TFD	p
Ki-67			1
Positivo	48 (77,4%)	14 (22,6%)	
Negativo	1 (100%)	0 (0 %)	
Media (DE)	31,71 (DE=22,41)	30,57 (DE=26,69)	0,872

Tabla 25. Resumen de los porcentajes de respuesta según la positividad de Ki-67.

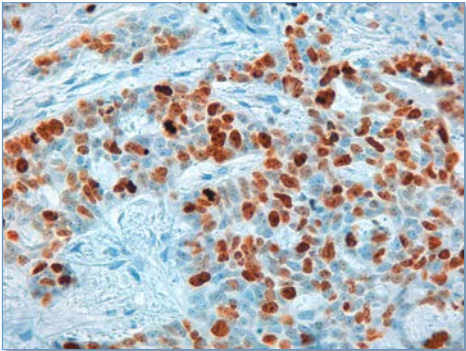


Fig. 53 Inmunoreactividad positiva para Ki-67 en CBC, con un 89% de sus células teñidas (Ki-67, x40).

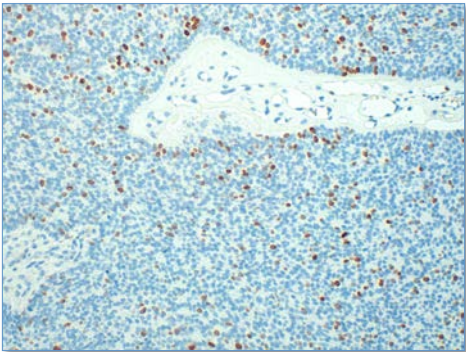


Fig. 54 Inmunoreactividad positiva para Ki-67 en CBC, con un 7% de sus células teñidas (Ki-67, x20).

F.3.3 Expresión de CD-31

El número medio de vasos con su endotelio teñido por el anticuerpo CD-31 en los CBCs respondedores fue 11 (DE=8,48), mientras que en los no respondedores fue de 9,78 (DE=6,93), ($p=0,626$) (fig. 55 y 56).

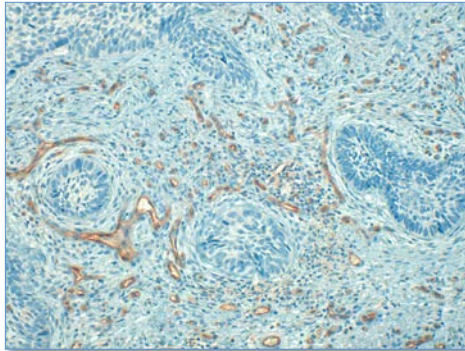


Fig. 55 Inmunoreactividad positiva alta en las células endoteliales (28 microvasos) (CD-31 x20).

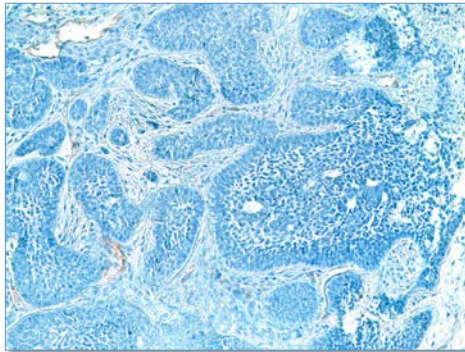


Fig. 56 Inmunoreactividad positiva baja en las células endoteliales (1 microvaso) (CD-31 x20).

F.3.4 Expresión de COX-2

El estudio de cicloxigenasa isoforma 2 o COX-2 fue positivo en un 46% de los casos (fig. 57). En el grupo en el que COX-2 fue positiva respondieron el 69% y en el grupo en que la inmunotinción fue negativa el porcentaje que respondió fue del 85,3%, ($p=0,12$) (fig. 58) (tabla 26).

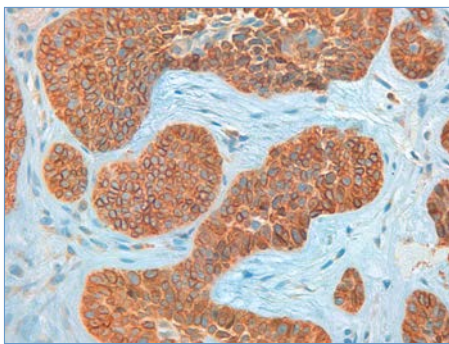


Fig. 57 Inmunoreactividad positiva fuerte para COX-2 en el citoplasma, con refuerzo perinuclear de las células basales tumorales (COX-2 x40).

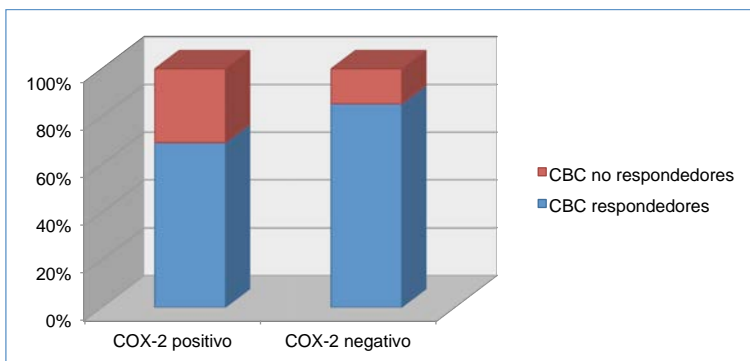


Fig. 58 Gráfico de barras que representa la tasa de respuesta en función de la positividad de COX-2.

Resistencias del Carcinoma Basocelular a la TFD con MAL

T. Gracia Cazaña

CBC	Respondedores a MAL-TFD	No respondedores a MAL-TFD	p
COX-2			0,12
Positivo	20 (69%)	9 (31%)	
Negativo	29 (85,3%)	5 (14,7%)	

Tabla 26. Resumen de los porcentajes de respuesta según la intensidad de la tinción para COX-2 en CBC.

F.3.5 Expresión de EGFR

Los tumores que presentaron EGFR positivo moderado-intenso fueron 39 (61,9%) (fig. 59), y en los 24 restantes la tinción fue positiva débil o negativa (38,1%) (fig. 60). En el caso de los CBCs que tenían tinción positiva moderada-intensa para EGFR se resolvieron el 76,9% de los casos, el porcentaje de respuesta fue similar, 79,2%, en los que la tinción fue positiva débil o negativa ($p=0,835$) (fig. 61) (tabla 27).

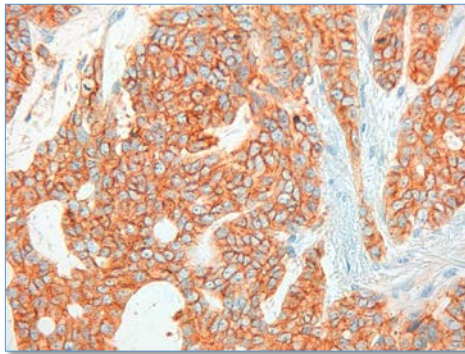


Fig. 59 Microfotografía con tinción positiva de intensidad fuerte citoplasmática con refuerzo de membrana para EGFR (EGFR x40).

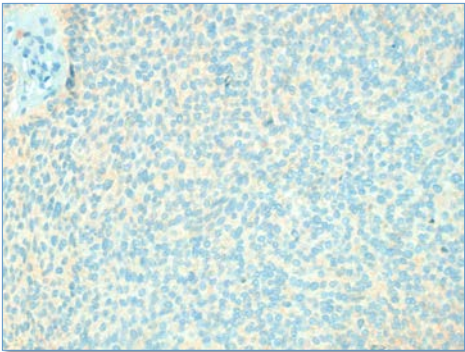


Fig. 60 Microfotografía con tinción negativa para EGFR (EGFR x40)

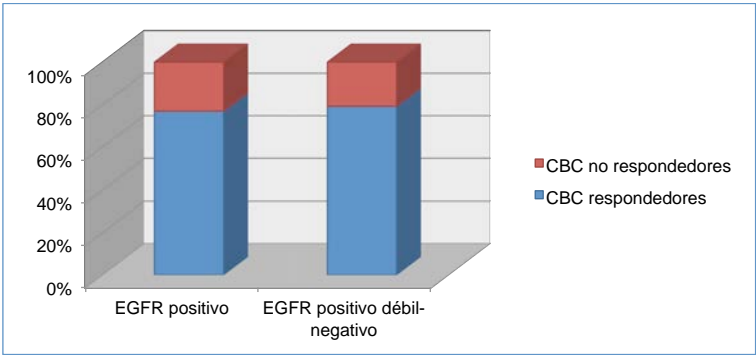


Fig. 61 Gráfico de barras que representa la tasa de respuesta en función de la intensidad de la inmunotinción de EGFR.

CBC	Respondedores a MAL-TFD	No respondedores a MAL-TFD	p
EGFR			0,835
Positivo moderado-intenso	30 (76,9%)	9 (23,1%)	
Positivo débil-Negativo	19 (79,2%)	5 (20,8%)	

Tabla 27. Resumen de los porcentajes de respuesta según la intensidad de la tinción para EGFR.

F.3.6 Expresión de β -catenina

La expresión de β -catenina en todos los casos la localización fue de membrana o citoplasma-membranosa, sin encontrar ningún caso con localización nuclear .Se clasificó en función de la intensidad de la tinción en moderado, débil y negativo. Veinticuatro casos (38,1%) tuvieron una tinción para β -catenina leve o negativa, y en 39 (61,9%) la inmunotinción fue moderada o intensa (fig. 62). Los CBCs con inmunotinción positiva moderada o intensa tuvieron una tasa de respuesta de 84,6% y en los que fue débil o negativa fue del 66,7% ($p=0,096$) (fig. 63) (tabla 29).

Además, se estudió si el patrón de la tinción era con refuerzo periférico de la empalizada del CBC o difuso sin refuerzo; se observó que en tres casos (4.34%) tenían refuerzo periférico y de esos tres ninguno respondió a TFD, resultando esta asociación estadísticamente significativa ($p=0,01$) (fig. 64 y 65) (tabla 28).

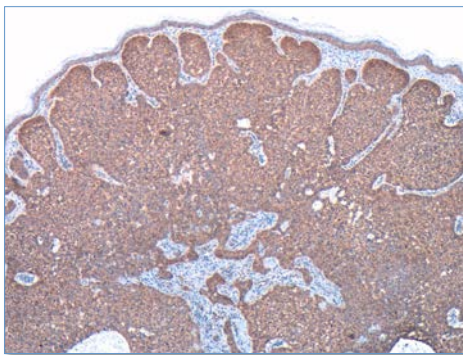


Fig. 62 Microfotografía con tinción positiva de intensidad fuerte citoplasmática y patrón difuso de tinción sin refuerzo de la empalizada para β -catenina (β -catenina x4).

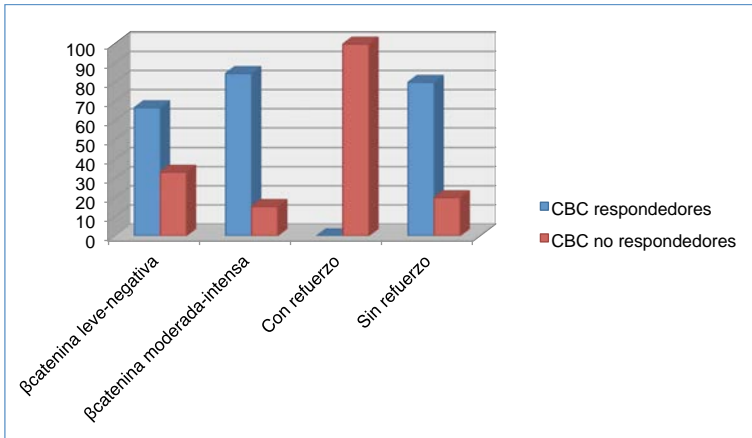


Fig. 63 Porcentajes de expresión mediante diagrama de barras según la intensidad de la inmunotinción y la distribución de β-catenina en CBCs respondedores y no respondedores a TFD.

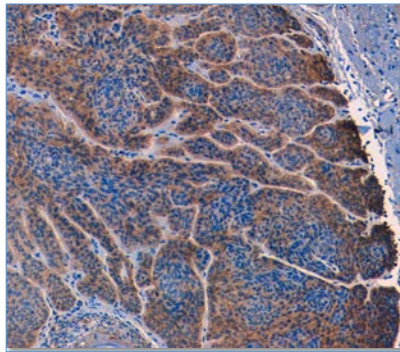


Fig. 64 Microfotografía con tinción positiva de intensidad moderada de localización citoplasmática con tinción reforzada en la periferia de los islotes para β-catenina (β-catenina x20).

Resistencias del Carcinoma Basocelular a la TFD con MAL

T. Gracia Cazaña

CBC	Respondedores a MAL-TFD	No respondedores a p MAL-TFD	
<i>β-catenina Intensidad</i>			0,096
Positivo moderado-intenso	33 (84,6%)	6 (15,4%)	
Positivo débil-Negativo	16 (66,7%)	8 (33,3%)	
<i>Distribución</i>			0,01
Refuerzo Periférico	0 (0%)	3 (100%)	
Sin Refuerzo Periférico	49 (79%)	11 (21%)	

Tabla 28. Resumen de los porcentajes de respuesta según la intensidad y la distribución de la tinción de β-catenina,.

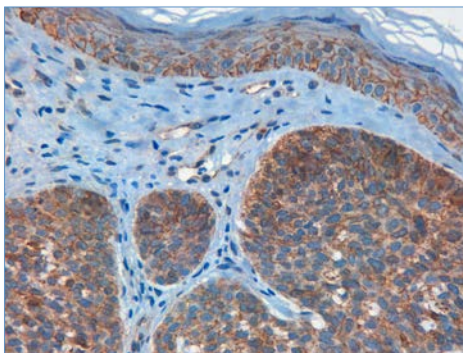


Fig. 65 Microfotografía con tinción positiva difusa citoplasmática con refuerzo de membrana y mayor expresión en la empalizada periférica (β-catenina x40).

F.3.7 Expresión de Survivina

La expresión de survivina como marcador antiapoptótico en CBC fue negativa o positiva pero débil en 23 casos (37,1%) de los cuales 18 respondieron (78,3%); en los que la tinción fue moderada o intensa que fueron los 39 casos restantes (62,9%) tuvieron unas tasas de respuesta del 76,9% ($p=0,903$). En todos los casos la inmunotinción fue nuclear. La distribución fue difusa en la mayoría, 49 casos (79%), con tasas de respuesta de 75,5% (fig. 66); en los 13 casos en los que la distribución

fue focal (21%), el 84,6% respondieron al tratamiento ($p=0,715$) (fig. 67). Los datos se resumen en la figura 68 y tabla 29.

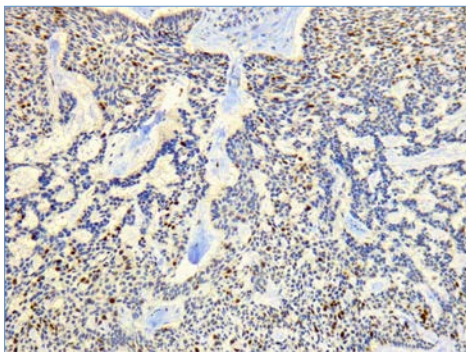


Fig. 66 Microfotografía con tinción positiva de intensidad moderada y patrón difuso de tinción para survivina (Survivina x5).

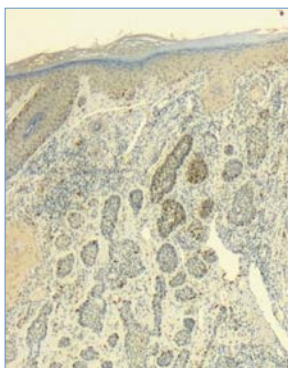


Fig. 67 Microfotografía con tinción positiva de intensidad moderada y patrón focal de tinción para survivina, (Survivina x2,5).

Resistencias del Carcinoma Basocelular a la TFD con MAL

T. Gracia Cazaña

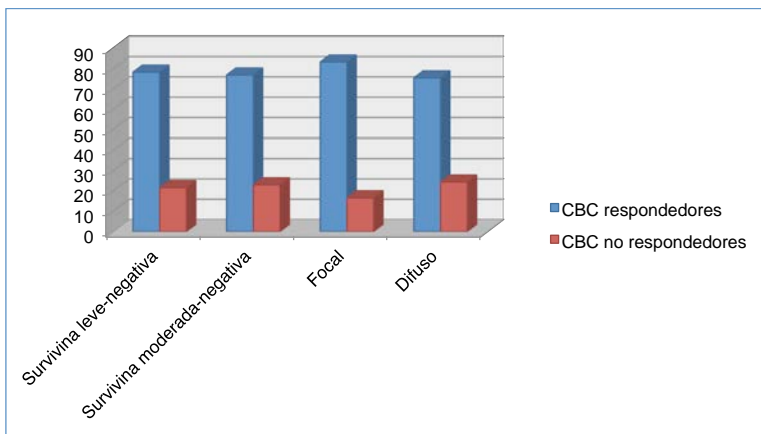


Fig. 68 Resumen de los porcentajes de respuesta según la intensidad y la distribución de la tinción de survivina.

CBC Superficial	Respondedores MAL-TFD	a	No respondedores a MAL-TFD	p
Survivina				0,903
Positivo moderado-intenso	30 (76,9%)		9 (23,1%)	
Positivo débil-negativo	18 (78,3%)		5 (21,7%)	
Desconocido	1			
Distribución				0,715
Focal	11 (84,6%)		2 (15,4%)	
Difuso	37 (75,5%)		12 (24,5%)	
Desconocido	1			

Tabla 29. Resumen de los porcentajes de respuesta según la intensidad y la distribución de la tinción de survivina.

F.4 ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Con el fin de estudiar la relación entre la respuesta a TFD con MAL y las características clínicas, histológicas y moleculares de los CBCs se realizó un análisis de regresión logística considerando como variable respuesta la curación tras la TFD y como variables explicativas aquellas con significación estadística ($p < 0,05$) o posibles confusoras ($p < 0,01$) en los test de asociación univariantes (edad, subtipo tumoral, localización, presencia de infiltrado inflamatorio peritumoral, la inmunotinción de P53 y el patrón de tinción de β -catenina). Describiendo las Odds Ratio con correspondiente intervalo de confianza al 95%, con criterio de entrada $p < 0,05$ y salida $p > 0,1$.

Considerando la transformación logística para relacionar p_i (probabilidad de que el paciente i se cure con TFD con MAL) con el predictor lineal, el modelo de regresión que considera el efecto de todas las variables explicativas que resultaron significativas en los test de asociación puede expresarse como:

$$(p_i) = \log (p_i / 1 - p_i) = \beta_0 + \beta_1 \cdot \text{edad} < 63 \text{ años} + \beta_2 \cdot \text{subtipo tumoral CBC nodular} + \beta_3 \cdot \text{localización en área H} + \beta_4 \cdot \text{presencia de infiltrado inflamatorio peritumoral} + \beta_5 \cdot \text{patrón de tinción de } \beta\text{-catenina} + \beta_6 \cdot \text{inmunotinción positiva de P53}$$

Para seleccionar el modelo que mejor describe los datos, se realizó una depuración del modelo y se aplicó a continuación el procedimiento automático de selección de variables por pasos hacia delante (Stepwise-forward), teniendo en cuenta el Bayesian Information Criterion (BIC). Este método consiste en partir de un modelo inicial sin ninguna variable explicativa y en cada paso, se prueba la inclusión en el modelo de cada una de las variables explicativas, de forma que se irán incluyendo aquellas variables para las que se obtiene una mejor calidad del ajuste del modelo según el valor del estadístico BIC. Finalmente, el modelo resultante es aquel que considera como variables explicativas: edad < 63 años, CBC patrón histológico nodular, inmunotinción positiva de P53 y presencia de infiltrado inflamatorio. Es decir:

$$(p_i) = \log (p_i / 1 - p_i) = \beta_0 + \beta_1 \cdot \text{edad} < 63 \text{ años} + \beta_2 \cdot \text{subtipo tumoral CBC nodular} + \beta_3 \cdot \text{presencia de infiltrado inflamatorio peritumoral} + \beta_4 \cdot \text{inmunotinción positiva de P53}$$

En la tabla 31 se muestran los resultados del modelo de regresión logística múltiple. La bondad de ajuste se evaluó mediante la prueba de Hosmer-Lemeshow ($p = 0,863$),

Resistencias del Carcinoma Basocelular a la TFD con MAL

T. Gracia Cazaña

y se describió la variabilidad explicada mediante R cuadrado de Nagelkerke ($p=0,742$).

Coeficientes	Estimación	Error estándar	P	Odds Ratio (IC 95%)
β_1 (edad <63 años)	0,263	0,096	0,006	1,3 (1,07-1,57)
β_2 (CBC nodular)	-6,28	2,89	0,029	0,02 (0,0-0,53)
β_3 (presencia de infiltrado inflamatorio)	3,59	1,52	0,018	36,4 (1,84-716,5)
β_4 (inmunotinción positiva de P53)	4,23	1,61	0,009	68,54 (2,94-159,8)

Tabla 30. Modelo de regresión logística múltiple resultante: edad, subtipo de CBC, presencia de infiltrado inflamatorio e inmunotinción positiva de P53.

F.5 CULTIVOS CELULARES

F.5.1 Inmunofluorescencia Indirecta de P53 en ASZ y BSZ.

Para confirmar que las células ASZ expresan P53 y que esta proteína no se detecta en BSZ, se realizó inmunofluorescencia indirecta (fig. 69).

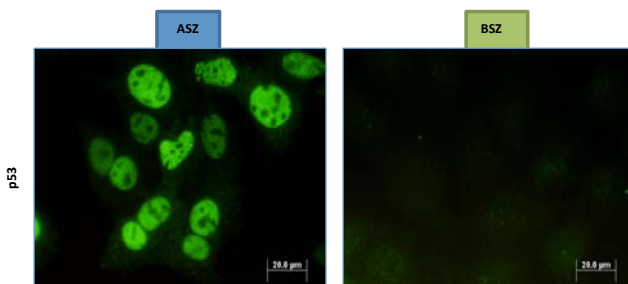


Fig. 69 Patrón de expresión de P53 en ASZ y BSZ. Barra de escala: 20 μm.

F.5.2 Migración celular de ASZ vs. BSZ

La capacidad de migración (valorada por el ensayo de cierre de “herida”) de ASZ y BSZ se valoró a las 5, 24, 30 y 48 horas tras la realización de las heridas. Las células se sembraron en los dos depósitos de cultivo celular de los injertos, que se retiraron cuando las células alcanzaron la confluencia (0 h). Como muestra la figura 70, BSZ mostró una mayor capacidad de cierre, ya que a las 5 horas la “herida” era más estrecha en BSZ y a las 24 horas la herida se cerró completamente en comparación con ASZ que a las 24 y 30 horas, aún se pudieron apreciar espacios entre las células.

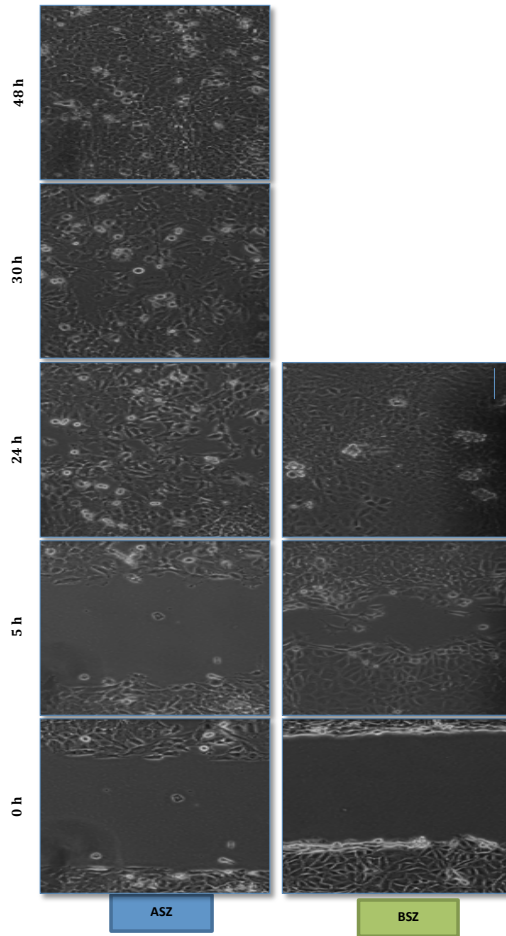


Fig. 70 Ensayo de cicatrización de heridas en ASZ y BSZ. Se realizaron fotografías de las heridas en ASZ y BSZ y se tomaron imágenes a las 0, 5, 24, 30 y 48 horas después de la realización de las heridas. Barra de escala: 200 μ m

F.5.3 Resultados de viabilidad celular tras tratamiento con TFD

Las células ASZ y BSZ se incubaron con MAL 0,3 mM durante 5 horas y posteriormente, las células se expusieron a diferentes dosis de luz roja (entre 0,45 J/cm² y 2,25 J/cm²). El ensayo del MTT se realizó 24 horas después del tratamiento fotodinámico. Como se muestra en la figura 71, los diferentes componentes de la TFD por ellos mismos (control de fármaco -0,3 mM MAL- y control de luz -2,25 J/cm²) no afectaron a la viabilidad de ninguno de los dos tipos celulares. Cuando las células se sometieron a TFD, las células ASZ presentaron una viabilidad del 35% mientras que en las BSZ era del 66%, con diferencias estadísticamente significativas entre ellas ($p < 0,01$). Esta diferencia puede verse en la figura 71 B donde hay una disminución de células vivas en ASZ (mayor abundancia de células redondeadas y con morfologías propias de células en proceso de muerte) en relación con BSZ tras TFD.

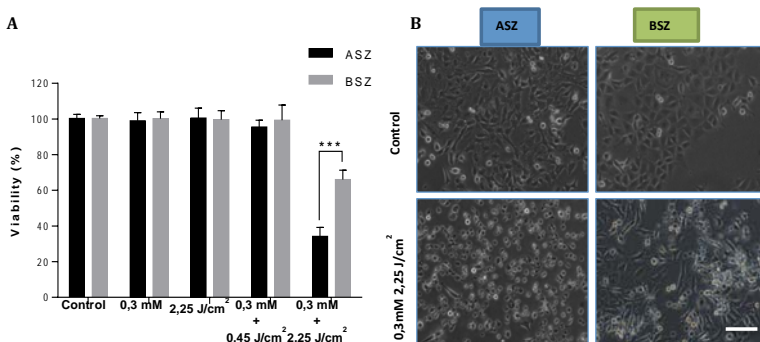


Fig. 71 A La viabilidad celular de ASZ y BSZ mediante el ensayo de MTT después de la aplicación de la TFD -0,3 mM Control de luz MAL -2,25 J/cm²- y TFD (0,3 mM MAL + 0,45 J/cm² y 0,3 mM MAL + 2,25 J/cm²) ($p < 0,01$); B Fotografías de ASZ y BSZ tras TFD. Barra de escala: 200 μm

G

DISCUSIÓN

En este estudio hemos valorado como diferentes factores clínico-patológicos y moleculares del Carcinoma Basocelular influyen en la respuesta a TFD con MAL, en una serie de 390 CBCs en 182 pacientes. Entre las variables clínicas se ha comprobado que los CBCs nodulares responden peor que los superficiales; otros factores asociados a mala respuesta son la localización en el área H de la cara, la edad más avanzada, los fototipos más oscuros, la historia personal de trasplante de órganos o los pacientes que han recibido un mayor número de sesiones. En relación a las variables anatómo-patológicas, la ausencia de infiltrado inflamatorio peritumoral previo es un factor de mala respuesta a la técnica. Por último hemos observado que la inmunoreactividad negativa a P53 y el patrón de tinción de β -catenina con refuerzo periférico de los islotes de células basaloideas se asocia a resistencia tumoral a la TFD. No obstante, y según nuestro modelo multivariante, tener una edad inferior a 63 años, la variante histológica superficial frente a la nodular, una inmunotinción positiva para p53 y la presencia de infiltrado inflamatorio peritumoral son los factores predictores de buena respuesta del CBC a la TFD con MAL.

El carcinoma de células basales (CBC) sigue siendo el cáncer más común de piel, con un rápido aumento de su incidencia en todo el mundo.¹ Los últimos datos sobre su incidencia global, mediante criterios clínicos e histológicos arrojan tasas de incidencia de 253,23/100.000 personas-año.²⁴⁴ Pese a su crecimiento lento y bajo potencial metastásico, tiene una alta capacidad de destrucción local de los tejidos.²⁴⁵ En la actualidad el tratamiento *gold-standard* sigue siendo la escisión quirúrgica; sin embargo, este tumor en ocasiones es de gran tamaño y se localiza en áreas fotoexpuestas, como la cara que es uno de los lugares que con más frecuencia asienta, si a esto le añadimos que se ha producido un cambio en la edad de aparición con una tendencia a manifestarse a edades más tempranas,^{246,247} el resultado cosmético puede ser un factor importante a la hora de la elección de la técnica, por todo ello se tiende a tratar con técnicas menos invasivas, como: la TFD, imiquimod, 5-FU, criocirugía o electrocoagulación.

Es fundamental individualizar el tratamiento en base a factores como la edad, comorbilidades, la adherencia y las preferencias del paciente.

La TFD tiene el beneficio de un mejor resultado estético en comparación con la escisión quirúrgica.²⁴⁸ Sin embargo, existen casos que no responden adecuadamente, y poco se sabe sobre el impacto de las características clínicas, histológicas e

inmunohistoquímicas que pueden influir en la respuesta para ayudar a guiar la selección de los pacientes más propensos a beneficiarse de la TFD.

G.1 VARIANTE DEL CBC Y ESPESOR TUMORAL

La TFD es una opción de tratamiento eficaz en CBC y su uso está respaldado por una cantidad creciente de investigaciones prospectivas, aleatorias y comparativas. En general, las tasas de curación para TFD en CBC oscila ampliamente en diferentes investigaciones, variando de 82 a 100% para CBC superficial^{198,200,219,249–255} y en los casos de CBC nodular presenta una respuesta completa inicial entre un 33% a un 100%,^{192,195,197,200,219,221,251–260} con tasas de respuesta completa a cinco años que oscilan entre el 69,3%-82%.^{192,196,261} Nuestros resultados confirman lo descrito en la literatura previamente, con tasas de respuesta mas altas en CBCs superficiales frente a CBCs nodulares (93,8% vs. 78,4%).

Las mejores respuestas se observan en aquellos casos en los que se realiza un pretatamiento de la lesión tumoral, de modo que el grosor de la lesión se reduce mediante curetaje, ablación con láser o se utilizan sustancias químicas que buscan aumentar la penetración del FS; o bien modificar el protocolo de iluminación con fraccionamiento de las dosis.

La eficacia de la TFD convencional en el tratamiento del CBC, presenta limitaciones ya conocidas como: la penetración del FS que aplicado de forma tópica no llega más allá de 1-2 mm, demostrándose mediante microscopía de fluorescencia que existe una distribución altamente selectiva y homogénea de MAL en las lesiones de espesor de hasta 2 mm y en las lesiones de mayor tamaño el fotosensibilizante pierde dos de sus principales propiedades la penetración y la selectividad.²⁶² Además, la penetración de la fuente de luz (generalmente roja) aplicada de forma externa igualmente está limitada a 5-6 mm.²⁵⁰

Por lo que es fundamental tener en cuenta el espesor de las lesiones como un determinante histológico del fracaso del CBC a TFD con MAL, aunque en ocasiones los datos publicados en la literatura sean contradictorios.^{200,213,251,263–265}

En este sentido, Morton *et al.*²⁶⁴ propusieron que la respuesta a la TFD tópica estaba en relación con el grosor de las lesiones; en el grupo de pacientes que trataron observaron que los tumores que tenían un grosor <1,0 mm respondieron bien y los de

más de 2 mm no respondieron al tratamiento. Otros trabajos publicados demuestran que la respuesta inicial al tratamiento decrece en relación con el grosor de la lesión tumoral, de un 60% en lesiones de 0.5-0.99 mm a un 33% en lesiones de 2 mm.²⁰⁰ En general, se indica que los CBCs con un espesor superior a 1,3 mm responden peor²⁶³

Sin embargo, otros trabajos, no resaltan una relación clara entre la respuesta a TFD y el espesor tumoral. En el estudio de Roozeboom *et al.*²¹³ en el que solo se incluyeron CBCs superficiales el espesor no pareció influir en la respuesta, sin embargo en todos los casos el espesor fue inferior a 1,0 mm; por lo tanto, de este estudio no se pudo realizar conclusiones sobre tumores más gruesos de 1,0 mm. Los hallazgos de McKay *et al.*²¹² indicaron que el grosor de la mayoría de los CBCs superficiales no supera 1,0 mm, por lo que la TFD es una excelente técnica para este subtipo.

También se ha demostrado que la supervivencia libre de enfermedad depende del grosor de la lesión, en lesiones de 0,7 mm o menos se sitúa en un 94% frente a las lesiones de más de 0,7 mm que se reduce hasta un 65%.²⁶¹

Estudios previos presentan altas tasas de respuestas completas y un gran resultado cosmético tanto en CBCs superficiales como en nodulares pero con recurrencias del 7% si los tumores tienen un grosor inferior a 2 mm y del 14% si es superior.²⁵¹

La medición del grosor de una lesión obtenido a través del estudio histológico de una biopsia puede no ser representativo del espesor del tumor. Puede que el área que realicemos la toma de la muestra no sea la de mayor grosor. En nuestro estudio los espesores se calcularon en las biopsias por curetaje o con punch de 4 mm en la zona más sobreelevada clínicamente del tumor. En los casos que se realizó con punch solamente contamos con una región que representa una parte del tumor total, sin embargo, se ha observado que cuando estamos ante un CBC de 1 mm de espesor o inferior, la discrepancia entre el grosor en la muestra de biopsia y la subsiguiente escisión quirúrgica es pequeña. Por el contrario, con el aumento del espesor tumoral (>2 mm) las mediciones individuales de los tumores pueden diferir considerablemente entre punch y la escisión.²⁶⁶ La mayoría de los casos el material histológico se obtuvo por curetaje, actualmente se apoya el uso de esta técnica ya que se ha comprobado que es más fiable que la biopsia mediante punch para establecer los factores de riesgo histológico del tumor, sin embargo en nuestro caso es posible que las diferencias entre el espesor tumoral y la respuesta a TFD no alcanzaran la significación estadística debido a que muchas de las biopsias se tomaron mediante esta técnica.²⁶⁷

Para obtener una valoración global de forma no invasiva de la lesión probablemente la ecografía cutánea y la microscopia confocal en la actualidad sean herramientas que puedan solventar esta limitación y nos permitan seleccionar aquellos tumores que sean candidatos a TFD.

G.2 FOTOTIPO

Poco se ha estudiado sobre la relación entre el fototipo y la respuesta a TFD. En nuestra serie los pacientes que presentaron fototipos altos (superior a III en la escala de Fitzpatrick) tuvieron peor respuesta a TFD que aquellos que tenían lugar en personas con fototipos \leq III, (89,1% vs. 66,7%) ($p=0,034$).

Rubin *et al.*⁵ comprobaron que el fototipo puede ser un factor intrínseco en relación con la etiología del CBC. Los fototipos más claros presentan rasgos fenotípicos como los ojos azules, pelo rubio o pelirrojo que son factores de riesgo para el desarrollo de CBC por su influencia en la respuesta a la RUV. Por ello en poblaciones caucásicas la incidencia es relativamente mayor que en poblaciones asiáticas con fototipos más oscuros (III-IV-V) que su incidencia es menor (4,1-18,9/100.000 personas en mayores de 60 años).²⁶⁸

La piel asiática (tipo IV/V) es más resistente a la penetración de la luz que la piel caucásica (tipo II/III). Un estudio llevado a cabo en asiáticos todos ellos con fototipo IV/V, reportaron tasas de respuesta completa de 89,5% (85/95), 77,9% (74/95) y 75,8% (72/95) a los 6, 12 y 24 meses respectivamente.²⁶³

Su peor respuesta puede ser debido a lo sucedido en los pacientes con fototipos más oscuros que se someten a tratamientos con láser. En ellos lo que sucede es que la absorción de energía inespecífica por cantidades relativamente grandes de melanina en la capa basal de la epidermis puede aumentar la lesión térmica inespecífica y conducir a un mayor riesgo de efectos adversos que conllevan un peor resultado estético con mayor atrofia local y peor cicatrización con hiperpigmentación. Además, la absorción competitiva por la melanina epidérmica disminuye sustancialmente la cantidad total de energía que puede llegar a las lesiones que se ubican en la dermis más profunda, haciendo más difícil el grado de destrucción de tejido necesario para producir el resultado clínico deseado y también por su efecto antioxidante por lo que una mayor cantidad de melanina ayuda a neutralizar los radicales libres producidos durante la TFD.²⁶⁹

La influencia del fototipo se puede extrapolar a los CBCs pigmentados que es ampliamente conocido que responden peor a la TFD debido a la presencia de melanina que reduce drásticamente la profundidad de penetración óptica, disminuyendo el efecto terapéutico.²⁷⁰

En base a nuestra experiencia, la TFD con MAL con curetaje previo que elimine el pigmento es una terapia igualmente efectiva para el tratamiento de CBC pigmentado como para CBC nodular, siempre que se elimine todo el pigmento macroscópico que impide la penetración de la fuente de luz.²⁷¹

G.3 NÚMERO DE SESIONES

Un parámetro que nos debe de hacer reflexionar es el número de sesiones. Hemos constatado que aquellos que recibieron un mayor número de sesiones respondieron peor. El mayor número de sesiones que recibieron fue debido a que no respondieron con 2 sesiones como es habitual.

Esto nos replantea que no por dar más sesiones van a responder mejor. En este sentido, nuestro grupo ha investigado la existencia de diferencias clínico-patológicas y moleculares entre CEC aparecidos en áreas tratadas con TFD frente a los que aparecen en regiones sin tratamiento fotodinámico previo. Los resultados obtenidos indicaron que los CEC aparecidos sobre áreas de TFD se relacionaba con un alto número de sesiones de TFD (>5).

Por todo ello es importante tener cautela a la hora de dar un alto número de sesiones de TFD por lo que en estos casos quizás sea de mayor utilidad y beneficio la asociación con otros tratamientos que el uso de TFD como monoterapia.²⁷²

G.4 EDAD

En los últimos años se ha observado un aumento sustancial de la incidencia y un cambio de edad con tendencia a una edad más temprana de aparición.²⁴⁶ Por otro lado, a medida que nuestra sociedad envejece es importante realizar estudios cuyo objetivo sea valorar la relación de la edad con los diferentes tratamientos. Si a esto le añadimos que la edad es un factor que afecta a la recurrencia en el CBC, independientemente del tratamiento, es interesante comprobarlo en el caso de la TFD.

²⁷³ En el presente estudio así como el que previamente realizamos en CBCs

pigmentados, hemos demostrado que la edad media de los no respondedores era más elevada que la de los respondedores, confirmando hallazgos previos,²²³ que demuestran una disminución asociada con la edad en la formación de PpIX en la piel humana.

Tehranchinia *et al.*²²⁰ en su estudio en 28 CBCs tratados con ALA comprobaron que la tasa de respuesta completa fue mayor en pacientes más jóvenes ($p < 0,01$) y aquellos con lesiones más pequeñas ($p < 0,001$). Sin embargo también hay artículos que no encuentran asociación entre la edad y la respuesta a TFD.^{200,213,274,275}

Lo mismo ocurre cuando lo que se evalúa es la recurrencia. Lindberg *et al.*²⁷⁶ comprobaron que los pacientes mayores de 60 años tenían tasas de recurrencia estimadas significativamente más altas en comparación con los pacientes de 60 años o menos (a los 12 meses, 35% vs. 19%, $p=0,01$), demostrando que la edad >60 años es un factor de riesgo independiente para la aparición de recurrencias. Por el contrario, Cabete *et al.*²⁷⁷ en su estudio realizado en 31 casos de EB y 44 de CBC superficial comprobó que la edad más joven fue un factor predictor independiente de recurrencia a largo plazo.

Aunque las neoplasias pueden desarrollarse en todas las edades, el riesgo general de desarrollar cáncer aumenta con la edad. Además se sabe que la edad avanzada está relacionada con una peor respuesta a tratamientos en muchas enfermedades, incluyendo las neoplasias.²⁷⁶

Estos dos hechos pueden explicar nuestros hallazgos. Y aunque nuestros datos demuestran una disminución significativa en la efectividad de la TFD en el tratamiento del CBC, debemos seguir realizando TFD en los pacientes mayores sobre todo en aquellos que asocian otras comorbilidades que dificultan o contrindican la cirugía u otros tratamientos no invasivos más difíciles de cumplimentar.

G.5 RECEPTORES DE TRANSPLANTE DE ÓRGANOS

En los receptores de transplante de órganos (RTO) la incidencia de CCNM es significativamente mayor en parte debido a la necesidad de inmunodepresión a largo plazo; ²⁷⁸ además la mejora de las técnicas de trasplante ha provocado un envejecimiento de esta población, ²⁷⁹ en la que el CCNM representa el 95% de las neoplasias en este grupo. La relación CBC: CEC (4:1) que se observa en la población inmunocompetente se invierte en los RTO, ²⁸⁰ y la incidencia de CBC se ha estimado 10 veces superior que en la población general. ²⁸¹ En estos pacientes se observan mayores tasas de mortalidad, debido a la mayor frecuencia y recurrencia de los tumores, por lo que el tratamiento del CCNM en RTO es un reto.

Se sabe que la eficacia de la TFD en QAs es inferior en los pacientes INMD por transplante de órganos. ²⁸² Sin embargo, la TFD es utilizada como profiláctico para el tratamiento del campo de cancerización ya que se ha observado una menor aparición de QAs en piel de RTO tratados con TFD en comparación con la piel no tratada. ²⁰⁵ Respecto a su eficacia en CBC en pacientes INMD por RTO el número de publicaciones es menor. ²⁸³ Schleier *et al.* ²⁰⁴ reportaron una serie de 32 CBCs faciales tratados mediante TFD con 5-ALA en 5 RTO, con una tasa de respuesta completa de 75% a los tres meses.

Respecto al tratamiento con MAL como FS las tasas de respuesta son superiores, en una serie de 18 CBCs en la cabeza y el tronco de pacientes RTO, solo hubo una recurrencia en una media de seguimiento de 22,6 meses concluyendo que la TFD parece ser una opción de tratamiento eficaz para el CBC en los RTO inmunosuprimidos. ²⁸⁴

Entre la principal hipótesis que sostiene una peor respuesta en RTO a TFD es debido a una obstaculización por la inmunosupresión inherente en los RTO de una respuesta inmune adecuada que es importante para la erradicación total de las células tumorales que contribuye a la eliminación de las células atípicas residuales. ²⁸⁵ Dado que solo hay un paciente en nuestro estudio receptor de transplante de órganos no podemos extraer ninguna conclusión.

G.6 LOCALIZACIÓN TUMORAL

La respuesta a la TFD fue correlacionada significativamente con la distribución del CBC, demostrándose que la respuesta terapéutica era más pobre en la zona media facial o zona H que en la zona de la cara no H (62,7% vs. 83,6%), lo cual es consistente con estudios previos publicados por otros autores.^{192,221,263}

Sin embargo, hay multitud de estudios con resultados diversos. Algunos de ellos no relacionan la localización con la respuesta, aunque en varios no se incluyeron CBCs faciales.^{194,213,222,274}

En otras ocasiones se han reportado diferentes localizaciones anatómicas como factores independientes con impacto negativo en la respuesta como las extremidades inferiores,²⁰⁰ incluso la localización en el tronco como determinante clínico en la recurrencia.²⁸⁶

Sin embargo, en muchas de las publicaciones que no relacionan la zona H como determinante de mala respuesta es porque generalmente no la incluyen en sus estudios. En la cara la zona H es el área más común de aparición de CBCs, es el área donde se localizan los planos de fusión embrionaria (regiones de migración mesenquimal y fusión de los cinco procesos faciales primordiales durante el día 5 hasta la semana 10 del desarrollo humano), es por ello que las células atípicas pueden penetrar a profundidades inesperadas a lo largo de estos planos y por ello provoca una alta tasa de recurrencia.^{287,288}

Por otro lado, se ha observado que los subtipos histológicos más agresivos se localizan en esta área por lo que puede ser otro factor que intervenga en esta relación.²⁸⁹

Es difícil explicar las diversas respuestas a la TFD en las diferentes áreas corporales. Se ha hipotetizado que los tumores en las zonas fotoexpuestas son más resistentes a los mecanismos moleculares de fotodaño.

G.7 INFILTRADO INFLAMATORIO PERITUMORAL

El proceso de resistencia puede deberse a factores tanto intrínsecos a las células tumorales, como extrínsecos, en los que el ambiente tumoral juega un papel relevante

en la respuesta a la terapia, al proporcionar gradientes de factores de señales, oxígeno y metabolitos.^{290,291}

Hemos comprobado que el único factor histológico estadísticamente significativo fue la presencia de un infiltrado linfocítico inflamatorio intenso en los tumores respondedores.

Previamente el papel de la inflamación se estudió en tumores de pacientes INMD que como hemos comentado previamente la inmunosupresión impide el reclutamiento de células inflamatorias.²⁹²

Está ampliamente demostrado que la TFD puede inducir una respuesta inmune innata en el paciente tratado, como consecuencia de una respuesta inflamatoria aguda. Se ha descrito que tiene lugar la activación del sistema del complemento, lo que da lugar a la liberación de ciertos mediadores secundarios, entre los que se incluyen citoquinas (IL-1b, IL-6, IL-10), el GCSF, la quimioquina derivada de queratinocitos, TNF- α , VEGF, COX-2, PGE, histamina o algunos factores de coagulación. Todo ello conduce a una acumulación, en la zona tratada, de células inflamatorias (como granulocitos y macrófagos), responsables de la eliminación de las células necróticas y apoptóticas.

188

Pero es muy importante el infiltrado inflamatorio previo, ya que se ha comprobado que los linfocitos y los macrófagos aumentan gradualmente a partir de la línea de base.²⁹³

Fundamentalmente se ha estudiado el papel de la inflamación tras la TFD. Debido a que la TFD representa un evento proinflamatorio que induce respuestas inmunes adaptativas que contribuyen a la muerte de células tumorales.²⁸⁵

Se ha estudiado como mejorar ese infiltrado inflamatorio y así, se ha demostrado que la respuesta inmune local es mejorada si se realiza un fraccionamiento de la luz cuando se trata con TFD con ALA, mejorando así las tasas de respuesta completa.

294,295

Además los fotosensibilizantes tópicos más usados, como el ALA o MAL, se acumulan en las células tumorales pero también en mastocitos, linfocitos activados, células dendríticas y monocitos.²⁹⁶

Nuestro grupo de investigación ya observó este hallazgo histológico en CEC que respondieron bien a TFD con MAL.²⁰⁸ Se ha observado que la presencia de infiltrado inflamatorio es un factor pronóstico en algunos tumores, como el melanoma,²⁹⁷ ya que

podría considerarse como una respuesta antitumoral del huésped, que contribuye o incluso aumenta el efecto de la TFD.²⁹⁸

G.8 VARIABLES MOLECULARES

La resistencia a nivel intrínseco puede ser debida a un complejo conjunto de factores, incluyendo los relacionados con la expresión de genes implicados en la propia génesis del CCNM y los derivados del proceso fotodinámico.²²⁴ En este sentido, las mutaciones en el ADN ocasionadas por la RUV en los genes supresores de tumores, como P53, son frecuentes, habiéndose descrito como eventos tempranos en la carcinogénesis cutánea en un 50% de CBCs y QAs, y en un 90% de CECs.²²⁶

También se ha descrito sobreexpresión de ciclina D1 en casi la mitad de QAs, modificaciones de la vía Wnt/B-catenina (implicada en CECs),²²⁷ y mutaciones en el gen PTCH1 (que codifica para el receptor de proteínas Hh) en CBCs.²²⁶

G.8.1 Expresión de β -catenina

β -catenina es una proteína multifuncional que controla una serie de actividades celulares, tanto en la membrana como a nivel nuclear. El puente entre el citoesqueleto y la unión cadherinas/ β -catenina regula las interacciones célula-célula.²⁹⁹

En el núcleo, β -catenina media la señalización Wnt/TCF, la regulación de un número de genes de transcripción, como la ciclina D1, MT1-MMP, survivina, MITF, TCF-1 y AXIN2, encargadas del control de la proliferación celular y la diferenciación.³⁰⁰

Se ha estudiado la expresión de β -catenina en la epidermis normal, evidenciándose una reactividad predominante a nivel de membrana a lo largo de la capa basal y el estrato espinoso. Ocasionalmente, se ha observado una tinción núcleo-citoplasmática en la capa basal, además también se ha visto expresada en los apéndices cutáneos.

³⁰⁰

En el caso del CBC la tinción de la β -catenina se ha visto influenciada tanto por el subtipo como por el grado histológico. La expresión de β -catenina generalmente se ha correlacionado con la agresividad tumoral.³⁰⁰

Oh *et al.*³⁰¹ compararon cincuenta y ocho muestras de diferentes subtipos histológicos de CBC (10 nodulares, 12 mixtos, 9 infiltrantes, 8 morfeiformes, 10 micronodulares y 9 basoescamosos), consideraron solo las muestras de CBC nodular

como de bajo riesgo y el resto de alto riesgo evidenciando que tanto β -catenina como MT1-MMP se encuentran más expresadas en los de alto riesgo, lo que indica que estas dos proteínas pueden desempeñar un papel importante en el crecimiento localmente invasivo y destructivo del CBC de alto riesgo. Nuestro estudio no pudo corroborar este hallazgo debido a que solo se incluyeron CBCs nodulares y superficiales excluyendo los CBCs de alto riesgo. En este sentido, es conocido que la interacción ente β -catenina y MT1-MMP, una potente enzima de degradación de la matriz extracelular que cuando se localiza en el frente de las células invasoras favorece la degradación de la barrera de la matriz extracelular lo cual facilita la invasión.^{301,302} Aunque también existen otros autores que no han encontrado ninguna correlación entre la expresión de β -catenina y el subtipo histológico.^{81,303,304}

Otro hallazgo es la localización subcelular de β -catenina, cuando esta se acumula a nivel nuclear se asocia a mayor proliferación tumoral y agresividad, hallándose en los subtipos más agresivos especialmente el micronodular; aunque se ha demostrado que en CBC el gen de β -catenina no está mutado y, por consiguiente, la señalización de Wnt dirigida por Hh sigue siendo la causa más probable de la acumulación nuclear de β -catenina en CBC.^{81,301}

Respecto a la relación de la expresión de β -catenina con la TFD, en los estudios in vitro, se ha descrito que esta proteína se degrada tras la inducción de la respuesta apoptótica mitocondrial.^{305,306} También se ha comprobado que β -catenina a las 18 horas tras tratamiento con TFD presenta un nivel de expresión estable y comienza su degradación cuando se elevan los niveles de Apaf-1 y el de la caspasa 3 activa.¹⁸⁵

Nuestro grupo en un estudio previo, aisló y caracterizó las células de carcinoma escamoso in vitro en la línea celular SCC-13 resistentes a la TFD con MAL. En este estudio no se observó un cambio de expresión en las proteínas de adhesión célula a célula como es la β -catenina, sin embargo sí que se demostró una mayor expresión de proteínas célula-sustrato en las células resistentes vs. las células parentales.¹⁵⁸

En el presente estudio hemos comprobado que los CBCs que respondieron peor a TFD con MAL tenían una característica en la inmunotinción con un patrón de tinción de β -catenina en el borde de avance con refuerzo en la empalizada. Ciurea *et al.*³⁰⁰, El-Bahrawy *et al.*³⁰⁷ y Oh *et al.*³⁰¹ comprobaron que en los CBCs con componente infiltrativo la tinción era mayor en el borde de avance y también en la periferia de los

nódulos en las variantes más indolentes (CBC nodular), esto apoya firmemente la hipótesis de que β -catenina desempeña un papel en la invasión tumoral.

En todos los casos la localización fue de membrana o citoplasma-membranosa, sin encontrar ningún caso localización nuclear que es la asociada a proliferación y agresividad; sin embargo un hallazgo a destacar es que cuando la tinción de β -catenina tenía una localización subcelular con predominio citoplasmático esta era a su vez en los tumores que había un refuerzo de la empalizada. La acumulación anormal en el citoplasma de β -catenina induce cambios de características celulares que conducen a la transición al fenotipo mesenquimal que a su vez facilita la migración e invasión que resulta en un aumento de la agresividad y recurrencia del tumor.³⁰⁸

G.8.2 Expresión de P53

Se han descrito mutaciones ocasionadas por la luz UV en el oncogén RAS y en el gen supresor de tumores P53, con una frecuencia del 50-90% en CCNM.²²⁶

La principal mutación descrita ocasionada por la luz UV es la mutación inactivante del gen supresor tumoral P53. Este gen desempeña un papel crucial en el control del crecimiento y la proliferación de la célula y en procesos de apoptosis y reparación del ADN, coordinando las respuestas celulares a diferentes tipos de estrés, entre los que se incluye la activación oncogénica, el daño al ADN o el estrés oxidativo.

En ausencia de actividad de P53, las células pierden este punto de control y pueden continuar la transformación hacia células tumorales.³⁰⁹

Cuando se produce una situación de estrés celular como el que se ocasiona tras la exposición UV, P53 ejerce su papel regulador de dos maneras: induciendo la parada del ciclo celular en G1 (lo que permite la reparación del ADN dañado antes de que se produzca su replicación), o provocando que la célula entre en apoptosis.³¹⁰

Se considera que las mutaciones en la proteína P53 son una aberración precoz, y un marcador de carcinogénesis temprana, observándose la en piel fotoexpuesta, es decir antes de que aparezcan modificaciones histológicas.³¹¹

En el caso de los CBCs las mutaciones en P53 se detectan aproximadamente en el 56% de los casos,⁴⁰ incrementándose en Enfermedad de Bowen 76,09% y en CECs invasivos hasta un 90%.³¹² Cuando se valora en inmunohistoquímica no es posible diferenciar si la sobreexpresión observada es de P53 nativo o mutado. De cualquier

modo, se sabe que la proteína mutada es mucho más estable que la proteína funcional que, al ser más lábil, sería más difícil de ser detectada por este método. Por este motivo, habitualmente se asocia la sobreexpresión a mutación.

Nuestros estudios previos demuestran que la TFD cuando se aplica a QAs reduce la expresión de ciclina D1, Ki-67 y P53.²²⁶ Por otro lado, los estudios que hemos realizado en CECs invasivos tratados con TFD y su relación con la respuesta observamos que todos los casos excepto en uno resistentes a TFD, la inmunotinción para P53 fue negativa esta diferencia no fue estadísticamente significativa probablemente por la limitación en el número de casos.²⁰⁸

Sin embargo el estudio que hemos llevado a cabo en casos de enfermedad de Bowen tratados con TFD con MAL, los que fueron resistentes a TFD presentaban en el 30% de los casos P53 positivo a diferencia de los que respondieron en los que P53 fue positivo en un 90,5% de los casos, resultando esta diferencia estadísticamente significativa, OR= 11,25 (IC=11.07-114.46). Además, en este mismo estudio llevamos a cabo un análisis in vitro en dos líneas celulares de CEC: SCC-13 y A-431, siendo estas últimas las que presentaban una mejor respuesta a TFD que las anteriores. Ello demuestra que la mayor expresión de P53 de las A-431, tanto en inmunofluorescencia como cuantificándola en Western blot, se relaciona con la mejor respuesta a TFD. Se ha hipotetizado que podría ser debido a una hiperactivación metabólica que conllevaría a una mayor producción de PpIX y por tanto a una mayor respuesta a la TFD, lo que concordaría con nuestros resultados en Enfermedad de Bowen y Carcinoma Basocelular.³¹³⁻³¹⁷

Respecto a este parámetro tan prometedor se han publicado otros estudios. Orringer *et al.*³¹⁸ estudiaron los efectos moleculares de la TFD en el fotoenvejecimiento evidenciando que los niveles basales de inmunotinción de P53 epidérmica pueden ser predictivos de las respuestas dérmicas a esta terapia, relacionándose con la expresión de citoqueratina 16 y de procolageno I tras el tratamiento; estos resultados sugieren que la piel que está más intensamente dañada por el sol puede ser más susceptible o respondedora a una lesión controlada (en ese caso láser colorante pulsado / TFD) y que dicha piel fotoenvejecida puede entonces responder particularmente bien en términos de neo-colagénesis y remodelación dérmica.

Además recientemente, se ha mostrado que el pretratamiento con 5-fluorouracilo (5-FU) antes de TFD aumenta la acumulación selectiva de PpIX y mejora la citotoxicidad

de la TFD en tumores epiteliales *in vivo*. Como hallazgo casual en este estudio se observó, que un aumento de P53 en tumores de la línea celular A431 pretratados con 5-FU, se relacionaba con una mejor respuesta, sugiriendo que P53 podría desempeñar algún papel en la mejora observada de los niveles de PpIX y la muerte celular posterior,³¹⁹ como se había concluido en diferentes estudios.^{320–322}

Diferentes grupos de investigación han intentado dar una explicación biológica, intentando demostrar que P53 puede interactuar con PpIX, y tal vez estabilizarlo, como ya se ha demostrado con P73 (un homólogo de P53 que rara vez se encuentra mutado en cánceres y que se une a PpIX a través de su dominio N-terminal, presumiblemente estabilizándolo).³²³ Kaeser *et al.*³²⁴ informaron que en células de carcinoma de colon HCT-116, PpIX es capaz de unirse a P53. Más tarde, Zawacka-Pankau *et al.*³²⁵ mostraron en cultivos celulares que PpIX se une a P53 en su extremo N-terminal y altera la interacción entre esta proteína y HDM2 (el homólogo humano de MDM2), lo que altera la regulación negativa de HDM2 a P53.

Aunque a primera vista podría parecer que la proteína P53 mutada no puede participar en la mediación de la muerte celular, porque falla al unirse al ADN, sin embargo, todavía puede unirse a otras proteínas reguladoras y a PpIX. Además, en ocasiones las mutaciones de P53, en lugar de causar una pérdida de la capacidad supresora de tumores, en realidad adquieren mayor estabilidad y ejercen efectos negativos dominantes sobre P53 de tipo no mutado, como mutantes de "ganancia de función".

La relación de P53 como un determinante en la conducción de la apoptosis después de la TFD es un tema que debe de estudiarse en más profundidad con datos contradictorios en la literatura. Fisher *et al.*³²⁶ publicaron la importancia de P53 en la muerte celular inducida por TFD, mientras que otros estudios sugieren que las respuestas a TFD son independientes del estado de P53.^{327,328}

Esto puede ser debido a la variabilidad de los diferentes tipos celulares y de los fotosensibilizantes que hacen que estos resultados sean difíciles de interpretar, pero creemos que es un biomarcador muy prometedor en este campo.

G.9 LIMITACIONES

- La principal limitación de nuestro trabajo es que se trata de un estudio retrospectivo.
- La ausencia de algunos datos no recogidos en la historia clínica como el tamaño y el fototipo, así como la disponibilidad de biopsias previas al tratamiento en algunos casos para no alterar el procedimiento clínico habitual fue una limitación ya que disminuye el tamaño muestral y la potencia estadística.
- La pérdida de seguimiento de un buen número de casos a largo plazo nos impide hacer un análisis de los factores que influyen en la respuesta del CBC a la TFD con MAL a largo plazo.

G.10 FUTURAS INVESTIGACIONES

A la luz de estos resultados hemos puesto en marcha el estudio comparativo histológico y molecular de aquellos tumores no respondedores a la TFD y que fueron extirpados siguiendo el protocolo de estudio que nuestro grupo ha publicado recientemente en Enfermedad de Bowen y en Carcinoma Escamoso. Esta investigación nos permitirá valorar la influencia de la TFD en la modificación de la biología del tumor y la posibilidad de inducción de resistencias.

H



CONCLUSIONES

H. CONCLUSIONES

- 1) La tasa de respuesta global en los pacientes con CBC tratados en la Unidad de Dermatología del Hospital San Jorge de Huesca desde el año 2006 hasta el 2015 fue de 82,8%, con un tiempo medio de seguimiento de 35,96 meses (DE=23,46), un mínimo de 3 meses y un máximo de 6 años.
- 2) Las variables clínicas de los CBCs que se asocian con mala respuesta a la TFD con MAL son: la variante nodular, la localización en área H, edad más avanzada, los fototipos IV, V y VI de Fitzpatrick o los pacientes que han recibido un mayor número de sesiones.
- 3) En relación a las variables anatómo-patológicas, la ausencia de infiltrado inflamatorio peritumoral previo es un factor de mala respuesta a la TFD con MAL.
- 4) Hemos demostrado que la inmunoreactividad negativa a P53 y el patrón de tinción de β -catenina con refuerzo periférico de los islotes de células basaloides se asocia a resistencia del carcinoma basocelular a la TFD con MAL.
- 5) La línea celular ASZ difiere de la línea celular BSZ en que expresa más P53 y al ser ambas líneas sometidas a tratamiento con TFD con MAL, la línea celular ASZ presenta una viabilidad menor que BSZ.
- 6) Según nuestro modelo multivariante, tener una edad inferior a 63 años, la variante histológica de superficial frente a la nodular, una inmunotinción positiva para p53 y la presencia de infiltrado inflamatorio peritumoral son los factores predictores de buena respuesta del CBC a la TFD con MAL.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tejera-Vaquerizo A, Descalzo-Gallego MA, Otero-Rivas MM, et al. Incidencia y mortalidad del cáncer cutáneo en España: revisión sistemática y metaanálisis. *Actas Dermosifiliogr.* 2016;107:318-328.
2. Jacobs GH, Rippey JJ, Altini M. Prediction of aggressive behavior in basal cell carcinoma. *Cancer.* 1982;49:533-537.
3. Jacobs A. Observations respecting an ulcer of peculiar character which attacks de eyelids and other parts of the face. *Dublin Hosp Rep.* 1827;4:231-239.
4. Herrera-Ceballos E, Herrera-Acosta E. Carcinoma basocelular: concepto e historia. *Monogr Dermatología.* 2003;16:65-66.
5. Rubin AI, Chen EH, Ratner D. Basal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2005;24:2262-2269.
6. Roewert-Huber J, Lange-Asschenfeldt B, Stockfleth E, et al. Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2007;157(Suppl. 2):47-51.
7. Revenga Arranz F, Paricio Rubio JF, Vázquez Salvado MM, et al. Descriptive epidemiology of basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma in Soria (north-eastern Spain) 1998-2000: A hospital-based survey. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2004;18:137-141.
8. Vilar-Coromina N, Miró-Queralt J, Cano-Bautista A, et al. [Non-melanoma skin cancer: incidence time trends analysis in Girona, Spain, 1994-2007]. *Med Clin (Barc).* 2011;137:145-151.
9. Snow SN, Sahl W, Lo JS, et al. Metastatic basal cell carcinoma. Report of five cases. *Cancer.* 1994;73:328-335.
10. Betti R, Bruscagin C, Inselvini E. Basal cell carcinomas of covered and unusual sites of the body. *Int J Dermatol.* 1997;36:503-505.
11. Negrín-Díaz M. Carcinoma Basocelular. *Dermatol Venez.* 2008;46:4-16.
12. Wu S, Han J, Li WQ, et al. Basal-Cell Carcinoma Incidence and Associated Risk Factors in US Women and Men. *Am J Epidemiol.* 2013;178:890-897.
13. Rosso S, Zanetti R, Martinez C, et al. The multicentre south European study "Helios". II: Different sun exposure patterns in the aetiology of basal cell and squamous cell carcinomas of the skin. *Br J Cancer.* 1996;73:1447-1454.
14. Zahnd WE, Goldfarb J, Scaife SL, et al. Rural-urban differences in behaviors to prevent skin cancer: An analysis of the Health Information National Trends Survey. *J Am Acad Dermatol.* 2010;62:950-956.
15. Sánchez G, Nova J, De La Hoz F. Factores de riesgo de carcinoma basocelular. Un estudio del Centro Nacional de Dermatología de Colombia. *Actas Dermosifiliogr.* 2012;103:294-300.
16. Corona R, Dogliotti E, D'Errico M, et al. Risk factors for basal cell carcinoma in a Mediterranean population: role of recreational sun exposure early in life.

- Arch Dermatol.* 2001;137:1162-1168.
17. Reddy KK. Vitamin D level and basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and melanoma risk. *J Invest Dermatol.* 2013;133:589-592.
18. Wong CS, Strange RC, Lear JT. Basal cell carcinoma. *BMJ.* 2003;327:794-798.
19. Gulia A, Altamura D, De Trane S, et al. Pigmented reticular structures in basal cell carcinoma and collision tumours. *Br J Dermatol.* 2010;162:442-444.
20. Sellheyer K, Cribier B, Nelson P, et al. Basaloid tumors in nevus sebaceus revisited: The follicular stem cell marker PHLDA1 (TDAG51) indicates that most are basal cell carcinomas and not trichoblastomas. *J Cutan Pathol.* 2013;40:455-462.
21. Özyazgan İ, Konaş O. Previous injuries or scars as risk factors for the development of basal cell carcinoma. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2004;38:11-15.
22. Fernandes BD, Caviggioli F, Di Tommaso L. Basal Cell Carcinoma Adjacent to Syringoma in Periorbital Skin. *Am J Dermatopathol.* 2005;27:362-363.
23. Castori M, Morrone A, Kanitakis J, et al. Genetic skin diseases predisposing to basal cell carcinoma. *Eur J Dermatology.* 2012;22:299-309.
24. Galand P, Heenen M. DNA replication fork progression rate and temporal organization of S phase in normal epidermis and in basal cell carcinoma. *J Cell Physiol.* 1988;137:374-377.
25. Bozdogan O, Erkek E, Atasoy P, et al. Bcl-2-related proteins, alpha-smooth muscle actin and amyloid deposits in aggressive and non-aggressive basal cell carcinomas. *Acta Derm Venereol.* 2002;82:423-427.
26. Wong DA, Bishop GA, Lowes MA, et al. Cytokine profiles in spontaneously regressing basal cell carcinomas. *Br J Dermatol.* 2000;143:91-98.
27. Barlogie B, Raber MN, Schumann J, et al. Flow Cytometry in Clinical Cancer Research Flow Cytometry in Clinical Cancer Research1. *Cancer Res.* 1983;43:3982-3997.
28. Saetta AA, Aroni K, Stamatelli A, et al. Expression of mismatch repair enzymes, hMLH1 and hMSH2 is not associated with microsatellite instability and P53 protein accumulation in basal cell carcinoma. *Arch Dermatol Res.* 2005;297:99-107.
29. Ingham PW, Placzek M. Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog. *Nat Rev Genet.* 2006;7:841-850.
30. López-Estebarez J. Treatment of Invasive Basal cell Carcinoma or the hedgehog pathway. *Piel.* 2012;27:425-428.
31. Quinn AG, Epstein E. Patched , Hedgehog , and Skin Cancer. *Methods Mol Biol.* 2003;222:85-95.
32. Barrett J, Hesterberg T, Thomassen D. Use of cell transformation systems for carcinogenicity testing and mechanistic studies of carcinogenesis. *Pharmacol Rev.* 1984;36:53s-70s.

33. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
34. Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol*. 1990;1:199-206.
35. Roa J. Marcadores moleculares: proliferación celular e inestabilidad microsatelital. *Gastr Latinoam*. 2003;14:195-199.
36. Abdelsayed R, Guijarro-Rojas M, Ibrahim N, et al. Immunohistochemical evaluation of basal cell carcinoma and trichiepithelioma using Bcl-2, Ki67, PCNA and P53. *J Cutan Pathol*. 2000;27:169-175.
37. Healy E, Angus B, Lawrence C, et al. Prognostic value of Ki67 antigen expression in basal cell carcinomas. *Br J Dermatol*. 1995;133:737-741.
38. Yerebakan O, Gıftcioglu MA, Akkaya BK, et al. Prognostic value of Ki-67, CD31 and epidermal growth factor receptor expression in basal cell carcinoma. *J Dermatol*. 2003;30:33-41.
39. Jonason AS, Kunala S, Price GJ, et al. Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:14025-14029.
40. Lacour JP. Carcinogenesis of basal cell carcinomas: genetics and molecular mechanisms. *Br J Dermatol*. 2002;146 Suppl:17-19.
41. Kim M, Park H, Baek S, et al. Mutations of the p53 and PCTH gene in basal cell carcinomas: UV mutation signature and strand bias. *J Dermatol Sci*. 2002;29:1-9.
42. Ouhtit A, Nakazawa H, Armstrong BK, et al. UV-radiation-specific p53 mutation frequency in normal skin as a predictor of risk of basal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90:523-531.
43. Auepemkiate S, Boonyaphiphat P, Thongsuksai P. p53 expression related to the aggressive infiltrative histopathological feature of basal cell carcinoma. *Histopathology*. 2002;40:568-573.
44. Hla T, Neilson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:7384-7388.
45. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*. 1998;12:1063-1073.
46. Fujiwaki R, Iida K, Kanasaki H, et al. Cyclooxygenase-2 expression in endometrial cancer: correlation with microvessel count and expression of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase. *Hum Pathol*. 2002;33:213-219.
47. Kokawa A, Kondo H, Gotoda T, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic neoplasms and potential for chemoprevention by cyclooxygenase inhibitors. *Cancer*. 2001;91:333-338.
48. Khuri FR, Wu H, Lee JJ, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression is a marker of poor prognosis in stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*.

- 2001;7:861-867.
49. Maekawa, M., Sugano K, Sano H, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 to -1 in human colorectal cancers and adenomas, but not in hyperplastic polyps. *Jpn J Clin Oncol*. 1998;28:421-426.
50. Ristimäki A, Nieminen O, Saukkonen K, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Am J Pathol*. 2001;158:849-853.
51. Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, et al. Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate*. 2000;42:73-78.
52. Abrahao AC, Castilho RM, Squarize CH, et al. A role for COX2-derived PGE2 and PGE2-receptor subtypes in head and neck squamous carcinoma cell proliferation. *Oral Oncol*. 2010;46:880-887.
53. An KP, Athar M, Tang X, et al. Cyclooxygenase- 2 expression in murine and human nonmelanoma skin cancers: implications for therapeutic approaches. *Photochem Photobiol*. 2002;76:73-80.
54. Yoshimoto T, Takahashi Y, Kinoshita T, et al. Growth stimulation and epidermal growth factor receptor induction in cyclooxygenase-overexpressing human colon carcinoma cells. *Adv Exp Med Biol*. 2002;507:403-407.
55. Pentland AP, Schoggins JW, Scott GA, et al. Reduction of UV-induced skin tumors in hairless mice by selective COX-2 inhibition. *Carcinogenesis*. 1999;20:1939-1944.
56. Nelson C, Rigel D, Smith S, et al. Phase IV, open-label assessment of the treatment of actinic keratosis with 3.0% diclofenac sodium topical gel (Solaraze). *J Drugs Dermatol*. 2009;3:401-407.
57. Isoherranen K, Punnonen K, Jansen C, et al. Ultraviolet irradiation induces cyclooxygenase-2 expression in keratinocytes. *Br J Dermatol*. 1999;140:1017-1022.
58. Chen Z, Yang J, Huang Q. Correlation and expression of COX-2 and P53 protein in basal cell carcinoma of eyelid. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*. 2009;29:383-386.
59. Kim KH, Park EJ, Seo YJ, et al. Immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 and p53 expression in skin tumors. *J Dermatol*. 2006;33:319-325.
60. Karagece Yalçın U, Seçkin S. The expression of p53 and COX-2 in basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and actinic keratosis cases. *Turk Patoloji Derg*. 2012;28:119-127.
61. Sivriköz O, Uyar B, Dağ F, et al. CXCR-4 and COX-2 expression in basal cell carcinomas and well-differentiated squamous cell carcinomas of the skin; their relationship with tumor invasiveness and histological subtype. *Turk Patoloji Derg*. 2015;31:30-35.
62. Tjiu J, Chen J, Shun C, et al. Tumor-associated macrophage-induced invasion and angiogenesis of human basal cell carcinoma cells by cyclooxygenase-2 induction. *J Invest Dermatol*. 2009;129:1016-1025.

63. Sako Y, Minoguchi S, Yanagida T. Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nat Cell Biol.* 2000;2:168-172.
64. Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: Signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Letters.* 1997;410:83-86.
65. Burgering BMT, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH Kinase signal transduction. *Lett Nat.* 1995;376:599.
66. Rittié L, Kansra S, Stoll SW, et al. Differential ErbB1 signaling in squamous cell versus basal cell carcinoma of the skin. *Am J Pathol.* 2007;170:2089-2099.
67. Eberl M, Klingler S, Mangelberger D, et al. Hedgehog-EGFR cooperation response genes determine the oncogenic phenotype of basal cell carcinoma and tumour-initiating pancreatic cancer cells. *EMBO Mol Med.* 2012;4:218-233.
68. Bartlett JM, Langdon SP, Simpson BJ, et al. The prognostic value of epidermal growth factor receptor mRNA expression in primary ovarian cancer. *Br J Cancer.* 1996;73:301-306.
69. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, et al. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem.* 2002;277:3247-3257.
70. Soares AR, Neves MG, Tome AC, et al. Glycophthalocyanines as photosensitizers for triggering mitotic catastrophe and apoptosis in cancer cells. *Chem Res Toxicol.* 2012;25:940-951.
71. Dallaglio K, Marconi A, Pincelli C. Survivin: a dual player in healthy and diseased skin. *J Invest Dermatol.* 2012;132:18-27.
72. Berney DM, Warren AY, Verma M, et al. Malignant germ cell tumours in the elderly: A histopathological review of 50 cases in men aged 60 years or over. *Mod Pathol.* 2008;21:54-59.
73. Chiodino C, Cesinaro A, Ottani D, et al. Communication: expression of the novel inhibitor of apoptosis survivin in normal and neoplastic skin. *J Invest Dermatol.* 1999;113:415-418.
74. Bowen AR, Hanks AN, Murphy KJ, et al. Proliferation, apoptosis, and survivin expression in keratinocytic neoplasms and hyperplasias. *Am J Dermatopathol.* 2004;26:177-181.
75. Park H, Min S, Cho H, et al. Expression profiles of p63, p53, survivin, and hTERT in skin tumors. *J Cutan Pathol.* 2004;31:544-549.
76. Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991;324:1-8.
77. Loggini B, Boldrini L, Gisfredi S, et al. CD34 Microvessel Density and VEGF Expression in Basal and Squamous Cell Carcinoma. *Pathol Res Pr.* 2003;199:705-712.
78. Chin CW, Foss AJ, Stevens A, et al. Differences in the vascular patterns of basal and squamous cell skin

- carcinomas explain their differences in clinical behaviour. *J Pathol.* 2003;200:308-313.
79. Pastushenko I, Gracia-Cazaña T, Vicente-Arregui S, et al. Squamous cell carcinomas of the skin explore angiogenesis-independent mechanisms of tumour vascularization. *J Ski Cancer.* 2014;2014:651501.
80. Luu H, Zhang R, Haydon R, et al. Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway as Novel Cancer Drug Targets. *Curr Cancer Drug Tar.* 2004;4:653-671.
81. Saldanha G, Ghura V, Potter L, et al. Nuclear beta-catenin in basal cell carcinoma correlates with increased proliferation. *Br J Dermatol.* 2004;151:157-164.
82. Bonifas J, Pennypacker S, Chuang P, et al. Activation of expression of hedgehog target genes in basal cell carcinomas. *J Invest Dermatol.* 2001;116:739-742.
83. Ying Y, Tao Q. Epigenetic disruption of the WNT/beta-catenin signaling pathway in human cancers. *Epigenetics.* 2009;4:307-312.
84. Giménez Arnau A, Pla Ferrer C. Carcinoma basocelular. Tipos clínicos y diagnóstico diferencial. *Actual dermatológica.* 2008;47:165-176.
85. Anthouli-Anagnostopoulou F, Hatzilou E. Recurrent morphean basal cell carcinoma of the skin. A clinico-histopathological study of 97 cases. *Adv Clin Path.* 2002;6:17-24.
86. Mckee P, Calonje E, Grauter S. *Tumors of the Surface Epithelium.*; 2005.
87. Walling HW, Fosko SW, Geraminejad PA, et al. Aggressive basal cell carcinoma: Presentation, pathogenesis, and management. *Cancer Metastasis Rev.* 2004;23:389-402.
88. Fuertes L, Santonja C, Kutzner H, et al. Immunohistochemistry in dermatopathology: a review of the most commonly used antibodies (part I). *Actas Dermosifiliogr.* 2013;104:99-127.
89. Pham TTN, Selim MA, Burchette JL, et al. CD10 expression in trichoepithelioma and basal cell carcinoma. *J Cutan Pathol.* 2006;33:123-128.
90. Swanson PE, Fitzpatrick MM, Ritter JH, et al. Immunohistologic differential diagnosis of basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and trichoepithelioma in small cutaneous biopsy specimens. *J Cutan Pathol.* 1998;25:153-159.
91. Kirchmann T, Prieto V, Smoller B. CD34 staining pattern distinguishes basal cell carcinoma from trichoepithelioma. *Arch Dermatol.* 1994;130:589-592.
92. Altamura D, Menzies SW, Argenziano G, et al. Dermatoscopy of basal cell carcinoma: Morphologic variability of global and local features and accuracy of diagnosis. *J Am Acad Dermatol.* 2010;62:67-75.
93. Demirtaşoğlu M, İlknur T, Lebe B, et al. Evaluation of dermoscopic and histopathologic features and their correlations in pigmented basal cell carcinomas. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2006;20:916-920.
94. Clark CM, Furniss M, Mackay-Wiggan

- JM. Basal cell carcinoma: An evidence-based treatment update. *Am J Clin Dermatol*. 2014;15:197-216.
95. Trakatelli M, Morton C, Nagore E, et al. Update of the European guidelines for basal cell carcinoma management. *Eur J Dermatol*. 2014;24:312-329.
96. Dandurand M, Petit T, Martel P, et al. Management of basal cell carcinoma in adults: Clinical practice guidelines. *Eur J Dermatol*. 2006;16:394-401.
97. Aguayo-Leiva IR, Ríos-Buceta L, Jaén-Olasolo P. Surgical vs nonsurgical treatment of basal cell carcinoma. *Actas Dermosifiliogr*. 2010;101:683-692.
98. Wolf DJ, Zitelli JA. Surgical margins for basal cell carcinoma. *Arch Dermatol*. 1987;123:340-344.
99. Kimyai-Asadi A, Goldberg LH, Jih MH. Accuracy of serial transverse cross-sections in detecting residual basal cell carcinoma at the surgical margins of an elliptical excision specimen. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53:469-474.
100. Burg G, Hirsch RD, Konz B, et al. Histographic Surgery: Accuracy of Visual Assessment of the Margins of Basal Cell Epithelioma. *J Dermatol Surg Oncol*. 1975;1:21-24.
101. Brodland D, Amonette R, Hanke C, et al. The history and evolution of Mohs micrographic surgery. *Derm Surg*. 2000;26:303-307.
102. Ríos-Buceta L, Picoto A. Cirugía de Mohs. *Actas Dermosifiliogr*. 2003;94:503-523.
103. Su SY, Giorlando F, Ek EW, et al. Incomplete excision of basal cell carcinoma: a prospective trial. *Plast Reconstr Surg*. 2007;120:1240-1248.
104. Holt PJ. Cryotherapy for skin cancer: results over a 5-year period using liquid nitrogen spray cryosurgery. *Br J Dermatol*. 1988;119:231-240.
105. Thissen M, Nieman F, Ideler A, et al. Cosmetic results of cryosurgery versus surgical excision for primary uncomplicated basal cell carcinomas of the head and neck. *Dermatol Surg*. 2000;26:759-764.
106. Jaramillo-Ayerbe F. Cryosurgery in difficult to treat basal cell carcinoma. *Int J Dermatol*. 2000;39:223-229.
107. Gaitanis G, Nomikos K, Vava E, et al. Immunocryosurgery for basal cell carcinoma: results of a pilot, prospective, open-label study of cryosurgery during continued imiquimod application. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009;23:1427-1431.
108. Spiller WF, Spiller RF. Treatment of basal cell epithelioma by curettage and electrodesiccation. *J Am Acad Dermatol*. 1984;11:808-814.
109. Rowe D, Carroll R, Day C. Long-term recurrence rates in previously untreated (primary) basal cell carcinoma: implications for patient follow-up. *J Dermatol Surg Oncol*. 1989;15:315-328.
110. Kopf AW, Bart RS, Schragar D, et al. Curettage-electrodesiccation treatment of basal cell carcinomas. *Arch Dermatol*. 1977;113:439-443.
111. Moskalik K, Kozlov A, Demin E, et al.

- The efficacy of facial skin cancer treatment with high-energy pulsed neodymium and Nd:YAG lasers. *Photomed Laser Surg.* 2009;27:345-349.
112. Gross K, Kircik L, Kricorian G. 5% 5-Fluorouracil cream for the treatment of small superficial basal cell carcinoma: Efficacy, tolerability, cosmetic outcome, and patient satisfaction. *Dermatologic Surg.* 2007;33:433-439.
113. Miller B, Shavin J, Cognetta A, et al. Nonsurgical treatment of basal cell carcinomas with intralesional 5-fluorouracil/epinephrine injectable gel. *J Am Acad Dermatol.* 1997;36:72-77.
114. Anasagasti-Angulo L, García-Vega Y, Barcelona-Perez S, et al. Treatment of advanced, recurrent, resistant to previous treatments basal and squamous cell skin carcinomas with a synergistic formulation of interferons. *BMC Cancer.* 2009;9:262.
115. Beutner KR, Geisse JK, Helman D, et al. Therapeutic response of basal cell carcinoma to the immune response modifier imiquimod 5% cream. *J Am Acad Dermatol.* 1999;41:1002-1007.
116. Geisse J, Caro I, Lindholm J, et al. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: Results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *J Am Acad Dermatol.* 2004;50:722-733.
117. Marks R, Owens M, Walters S. Efficacy and safety of 5% imiquimod cream in treating patients with multiple superficial basal cell carcinomas. *Arch Dermatol.* 2004;140:1284-1285.
118. Schulze HJ, Cribier B, Requena L, et al. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from a randomized vehicle-controlled phase III study in Europe. *Br J Dermatol.* 2005;152:939-947.
119. Geisse JK, Rich P, Pandya A, et al. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: A double-blind, randomized, vehicle-controlled study. *J Am Acad Dermatol.* 2002;47:390-398.
120. Marks R, Gebauer K, Shumack S, et al. Imiquimod 5% cream in the treatment of superficial basal cell carcinoma: results of a multicenter 6-week dose-response trial. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44:807-813.
121. Quirk C, Gebauer K, Owens M, et al. Two-year interim results from a 5-year study evaluating clinical recurrence of superficial basal cell carcinoma after treatment with imiquimod 5% cream daily for 6 weeks. *J Dermatol.* 2006;47:258-265.
122. Gollnick H, Barona C, Frank R, et al. Recurrence rate of superficial basal cell carcinoma following successful treatment with imiquimod 5% cream: interim 2-year results from an ongoing 5-year follow-up study in Europe. *Eur J Dermatol.* 2005;15:374-381.
123. Gollnick H, Barona C, Frank R, et al. Recurrence rate of superficial basal cell carcinoma following successful treatment with imiquimod 5% cream: interim 2-year results from an ongoing 5-year follow-up study in Europe. *Eur J Dermatol.* 2005;15:374-381.

124. Peris K, Campione E, Micantonio T, et al. Imiquimod treatment of superficial and nodular basal cell carcinoma: 12-week open-label trial. *Dermatol Surg.* 2005;31:318-323.
125. Ruíz-Villaverde R, Sánchez-Cano D, Burkhardt-Perez P. Superficial basal cell carcinoma treated with imiquimod 5% topical cream for a 4-week period: a case series. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2009;23:828-831.
126. Dauden E. Effectiveness and satisfaction with imiquimod for the treatment of superficial basal cell carcinoma in daily dermatological practice. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011;25:1304-1310.
127. Serra-Guillen C, Nagore E, Guillen C. Photodynamic therapy vs imiquimod. *Actas Dermosifiliogr.* 2012;103:488-501.
128. Marín A, Vargas-Díez E, Cerezo L. Radioterapia en dermatología. *Actas Dermosifiliogr.* 2009;100:166-181.
129. Dubin N, Kopf AW. Multivariate risk score for recurrence of cutaneous basal cell carcinomas. *Arch Dermatol.* 1983;119:373-377.
130. Hall VL, Leppard BJ, McGill J, et al. Treatment of basal-cell carcinoma: Comparison of radiotherapy and cryotherapy. *Clin Radiol.* 1986;37:33-34.
131. Avril MF, Auperin A, Margulis A, et al. Basal cell carcinoma of the face: surgery or radiotherapy? Results of a randomized study. *Br J Cancer.* 1997;76:100-106.
132. Cirrone F, Harris CS. Vismodegib and the hedgehog pathway: a new treatment for Basal cell carcinoma. *Clin Ther.* 2012;34:2039-2050.
133. Von Hoff D, LoRusso P, Rudin C, et al. Inhibition of the Hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2009;361:1164-1172.
134. Sekulic A, Migden M, Oro A, et al. Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2012;366:2171-2179.
135. Tang JY, Mackay-Wiggan JM, Aszterbaum M, et al. Inhibiting the hedgehog pathway in patients with the basal-cell nevus syndrome. *N Engl J Med.* 2012;366:2180-2188.
136. Di Magno L, Coni S, Di Marcotullio L, et al. Digging a hole under Hedgehog: Downstream inhibition as an emerging anticancer strategy. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2015;1856:62-72.
137. Lauth M, Bergström Å. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:8455-8460.
138. Boulinguez S, Grison-Tabone C, Lamant L, et al. Histological evolution of recurrent basal cell carcinoma and therapeutic implications for incompletely excised lesions. *Br J Dermatol.* 2004;151:623-626.
139. Van Iersel C, Van de Velden H, Kusters C. Prognostic factors for a subsequent basal cell carcinoma: implications for follow up. *BMJ.* 2005;153:1067-1092.
140. Spates ST, Mellette JR, Fitzpatrick J.

- Metastatic basal cell carcinoma. *Dermatol Surg.* 2003;29:650-652.
141. Marcil I, Stern RS. Risk of developing a subsequent nonmelanoma skin cancer in patients with a history of nonmelanoma skin cancer: a critical review of the literature and meta-analysis. *Arch Dermatol.* 2000;136:1524-1530.
142. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nmsc.pdf.
143. Chen J, Ruzinski I, Jorgensen TJ, et al. Nonmelanoma skin cancer and risk for subsequent malignancy. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100:1215-1222.
144. Mc Loone NM, Tolland J, Walsh M, et al. Follow-up of basal cell carcinomas: An audit of current practice. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2006;20:698-701.
145. Silverman MK, Kopf AW, Grin CM, et al. Recurrence Rates of Treated Basal Cell Carcinomas: Part 2: Curettage-Electrodesiccation. *J Dermatol Surg Oncol.* 1991;17:720-726.
146. Gilaberte Y. *Terapia Fotodinámica.* Madrid: Grupo Aula Médica.; 2008.
147. Fernández-Guarino M, García-Morales I, Harto A, et al. Photodynamic Therapy: New Indications. *Actas Dermo-Sifiliográficas.* 2007;98:377-395.
148. Dougherty T. Photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 1993;58:895-900.
149. Kennedy J, Pottier R. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 1992;14:275-292.
150. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:250-281.
151. Allison RR, Moghissi K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. *Clin Endosc.* 2013;46:24-29.
152. Stapleton M, Rhodes L. Photosensitizers for photodynamic therapy of cutaneous disease. *J Dermatol Treat.* 2003;14:107-112.
153. Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J Natl Cancer Inst.* 1961;26:1-11.
154. Dougherty T, Potter W, Weishaupt K. The structure of the active component of hematoporphyrin derivative. *Prog Clin Biol Res.* 1984;170:301-314.
155. Yoon I, Li J, Shim Y. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clin Endosc.* 2013;46:7-23.
156. Acedo P, Stockert J, Cañete M, et al. Two combined photosensitizers: a goal for more effective photodynamic therapy of cancer. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1122.
157. Gauthier JM, Geze M, Santus R, et al. Subcellular localization of and photosensitization by protoporphyrin IX in human keratinocytes and fibroblasts cultivated with 5-aminolevulinic acid. *Photochem Photobiol.* 1995;62:114-122.
158. Milla LN, Cogno IS, Rodríguez ME, et al. Isolation and characterization of

- squamous carcinoma cells resistant to photodynamic therapy. *J Cell Biochem.* 2011;112:2266-2278.
159. Juarranz Á, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, et al. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin Transl Oncol.* 2008;10:148-154.
160. Darlenski R, Fluhr JW. Photodynamic therapy in dermatology: past, present, and future. *J Biomed Opt.* 2013;18:61208.
161. Gilaberte Y, Serra-Guillén C, De Las Heras ME, et al. Terapia fotodinámica en dermatología. *Actas Dermosifiliogr.* 2006;97:83-102.
162. Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin. IX: Basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B Biol.* 1990;6:143-148.
163. Uehlinger P, Zellweger M, Wagnières G, et al. 5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. *J Photochem Photobiol B.* 2000;54:72-80.
164. Siddiqui MAA, Perry CM, Scott LJ. Topical methyl aminolevulinate. *Am J Clin Dermatol.* 2004;5:127-137.
165. Morton CA , Brown SB, Collins S, et al. Guidelines for topical photodynamic therapy: report of a workshop of the British Photodermatology Group. *Br J Dermatol.* 2002;146:552-567.
166. Fritsch C, Goerz G, Ruzicka T. Photodynamic therapy in dermatology. *Arch Dermatol.* 1998;134:207-214.
167. Wilson BC, Patterson MS. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol.* 2008;53:61-109.
168. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2004;1:279-293.
169. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three - Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2005;2:91-106.
170. Kessel D. Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci.* 2002;1:837-840.
171. Jensen TJ, Vicente MGH, Luguya R, et al. Effect of overall charge and charge distribution on cellular uptake, distribution and phototoxicity of cationic porphyrins in HEp2 cells. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2010;100:100-111.
172. Kessel D. Correlation between subcellular localization and photodynamic efficacy. *J Porphyr Phthalocyanines.* 2004;8:1009-1014.
173. Begum G, Dube A, Joshi PG, et al. Chlorin p6 preferentially localizes in endoplasmic reticulum and Golgi apparatus and inhibits Ca²⁺ release from intracellular store. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2009;95:177-184.

174. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J.* 2016;473:347-364.
175. Bacellar IO, Tsubone TM, Pavani C, et al. Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death. *Int J Mol Sci.* 2015;16:20523-20559
176. Berg K, Moan J. Lysosomes and microtubules as targets for photochemotherapy of cancer. *Photochem Photobiol.* 1997;65:403-409.
177. Di Venosa G, Rodriguez L, Mamone L, et al. Changes in actin and E-cadherin expression induced by 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in normal and Ras-transfected human mammary cell lines. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2012;106:47-52.
178. Uzdensky A, Kristiansen B, Moan J, et al. Dynamics of signaling, cytoskeleton and cell cycle regulation proteins in glioblastoma cells after sub-lethal photodynamic treatment: Antibody microarray study. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2012;1820:795-803.
179. Bowne-Anderson H, Zanic M, Kauer M, et al. Microtubule dynamic instability: A new model with coupled GTP hydrolysis and multistep catastrophe. *BioEssays.* 2013;35:452-461.
180. Schappi JM, Krbanjevic A, Rasenick MM. Tubulin, actin and heterotrimeric G proteins: Coordination of signaling and structure. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2014;1838:674-681.
181. Uzdensky A, Kolpakova E, Juzeniene A, et al. The effect of sub-lethal ALA-PDT on the cytoskeleton and adhesion of cultured human cancer cells. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2005;1722:43-50.
182. Chiaviello A, Postiglione I, Palumbo G. Targets and mechanisms of photodynamic therapy in lung cancer cells: A brief overview. *Cancers (Basel).* 2011;3:1014-1041.
183. Farahani E, Patra HK, Jangamreddy JR, et al. Cell adhesion molecules and their relation to (cancer) cell stemness. *Carcinogenesis.* 2014;35:747-759.
184. Espada J, Galaz S, Sanz-Rodríguez F, et al. Oncogenic H-Ras and PI3K signaling can inhibit e-cadherin-dependent apoptosis and promote cell survival after photodynamic therapy in mouse keratinocytes. *J Cell Physiol.* 2009;219:84-93.
185. Galaz S, Espada J, Stockert JC, et al. Loss of E-cadherin mediated cell-cell adhesion as an early trigger of apoptosis induced by photodynamic treatment. *J Cell Physiol.* 2005;205:86-96.
186. Milla Sanabria L, Rodríguez ME, Cogno IS, et al. Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2013;1835:36-45.
187. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: Part two - Cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2005;2:1-23.
188. Cecic I, Stott B, Korbek M. Acute phase

- response-associated systemic neutrophil mobilization in mice bearing tumors treated by photodynamic therapy. *Int Immunopharmacol.* 2006;6:1259-1266.
189. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ.* 2015;22:58-73.
190. Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, et al. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12:385-392.
191. Braathen LR, Szeimies RM, Basset-Seguín N, et al. Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: an international consensus. International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology, 2005. *J Am Acad Dermatol.* 2007;56:125-143.
192. Christensen E, Skogvoll E, Viset T, et al. Photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid, dimethylsulfoxide and curettage in basal cell carcinoma: a 6-year clinical and histological follow-up. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2009;23:58-66.
193. Basset-Seguín N, Ibbotson SH, Emtestam L, et al. Topical methyl aminolaevulinate photodynamic therapy versus cryotherapy for superficial basal cell carcinoma: A 5 year randomized trial. *Eur J Dermatology.* 2008;18:547-553.
194. Szeimies RM, Ibbotson S, Murrell DF, et al. A clinical study comparing methyl aminolevulinate photodynamic therapy and surgery in small superficial basal cell carcinoma (8-20 mm), with a 12-month follow-up. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2008;22:1302-1311.
195. Rhodes LE, de Rie M, Enström Y, et al. Photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinate vs surgery for nodular basal cell carcinoma: results of a multicenter randomized prospective trial. *Arch Dermatol.* 2004;140:17-23.
196. Rhodes L, de Rie M, Leifsdóttir R, et al. Five-year follow-up of a randomized, prospective trial of topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy vs surgery for nodular basal cell carcinoma. *Arch Dermatol.* 2007;143:1131-1136.
197. Foley P, Freeman M, Menter A, et al. Photodynamic therapy with methyl aminolevulinate for primary nodular basal cell carcinoma: results of two randomized studies. *Int J Dermatol.* 2009;48:1236-1245.
198. Arits A, Mosterd K, Essers B, et al. Photodynamic therapy versus topical imiquimod versus topical fluorouracil for treatment of superficial basal-cell carcinoma: a single blind, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2013;14:647-654.
199. Wang H, Xu Y, Shi J, et al. Photodynamic therapy in the treatment of basal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2015;31:44-53.
200. Fantini F, Greco A, Del Giovane C, et al. Photodynamic therapy for basal cell carcinoma: clinical and pathological determinants of response. *J Eur Acad*

- Dermatol Venereol.* 2011;25:896-901.
201. Kuijpers DI, Thissen MR, Thissen CA, Neumann MH. Similar effectiveness of methyl aminolevulinate and 5-aminolevulinate in topical photodynamic therapy for nodular basal cell carcinoma. *J Drugs Dermatol.* 2006;5:642-645.
202. de Haas E, Kruijt B, Sterenborg H, et al. Fractionated illumination significantly improves the response of superficial basal cell carcinoma to aminolevulinic acid photodynamic therapy. *J Invest Dermatol.* 2006;126:2679-2686.
203. Loncaster J, Swindell R, Slevin F, et al. Efficacy of Photodynamic Therapy as a Treatment for Gorlin Syndrome-related Basal Cell Carcinomas. *Clin Oncol.* 2009;21:502-508.
204. Schleier P, Hyckel P, Berndt A, et al. Photodynamic therapy of virus-associated epithelial tumours of the face in organ transplant recipients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2004;130:279-284.
205. Wulf HC, Pavel S, Stender I, et al. Topical photodynamic therapy for prevention of new skin lesions in renal transplant recipients. *Acta Derm Venereol.* 2006;86:25-28.
206. Pauwels C, Mazereeuw-Hautier J, Basset-Seguín N, et al. Topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy for management of basal cell carcinomas in patients with basal cell nevus syndrome improves patient's satisfaction and reduces the need for surgical procedures. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2011;25:861-864.
207. Caekelbergh K, Annemans L, Lambert J, et al. Economic evaluation of methyl aminolevulinate-based photodynamic therapy in the management of actinic keratosis and basal cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2006;155:784-790.
208. Gilaberte Y, Milla L, Salazar N, et al. Cellular intrinsic factors involved in the resistance of squamous cell carcinoma to photodynamic therapy. *J Invest Dermatol.* 2014;134:2428-2437.
209. Kasche A, Luderschmidt S, Ring J, et al. Photodynamic therapy induces less pain in patients treated with methyl aminolevulinate compared to aminolevulinic acid. *J Drugs Dermatol.* 2006;5:353-356.
210. Halldin C, Gillstedt M, Paoli J, et al. Predictors of pain associated with photodynamic therapy: a retrospective study of 658 treatments. *Acta Derm Venereol.* 2011;91:545-551.
211. Morton CA, Szeimies RM, Sidoroff A, et al. European guidelines for topical photodynamic therapy part 1: Treatment delivery and current indications - Actinic keratoses, Bowen's disease, basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2013;27:536-544.
212. McKay KM, Sambrano BL, Fox PS, et al. Thickness of superficial basal cell carcinoma (sBCC) predicts imiquimod efficacy: A proposal for a thickness-based definition of sBCC. *Br J Dermatol.* 2013;169:549-554.
213. Roozeboom MH, Van Kleef L, Arits AHMM, et al. Tumor thickness and adnexal extension of superficial basal cell carcinoma (sBCC) as determinants

- of treatment failure for conventional treatment. *Br J Dermatol.* 2003;149:1242-1249.
220. Tehranchinia Z, Rahimi H, Ahadi MS, et al. Aminolevulinic Acid-photodynamic therapy of Basal cell carcinoma and factors affecting the response to treatment: a clinical trial. *Indian J Dermatol.* 2013;58:327.
214. Christensen E, Mørk C, Foss OA. Pre-Treatment Deep Curettage Can Significantly Reduce Tumour Thickness in Thick Basal Cell Carcinoma While Maintaining a Favourable Cosmetic Outcome When Used in Combination with Topical Photodynamic Therapy. *J Skin Cancer.* 2011;2011:1-6.
221. Vinciullo C, Elliott T, Francis D, et al. Photodynamic therapy with topical methyl aminolaevulinate for "difficult-to-treat" basal cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2005;152:765-772.
215. Serra Guillén C, Guillén Barona C. Terapia fotodinámica en cáncer cutáneo no melanoma: queratosis actínicas, carcinoma basocelular y carcinoma espinocelular. *Monogr Dermatol.* 2014;número ext:27-33.
222. Morton C a, Whitehurst C, McColl JH, et al. Photodynamic therapy for large or multiple patches of Bowen disease and basal cell carcinoma. *Arch Dermatol.* 2001;137:319-324.
216. Ramirez DP, Kurachi C, Inada NM, et al. Experience and BCC subtypes as determinants of MAL-PDT response: Preliminary results of a national Brazilian project. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2014;11:22-26.
223. Nissen CV., Philipsen PA, Wulf HC. Protoporphyrin IX formation after topical application of methyl aminolaevulinate and BF-200 aminolaevulinic acid declines with age. *Br J Dermatol.* 2015;173:760-766.
217. Christensen E, Warloe T, Kroon S, et al. Guidelines for practical use of MAL-PDT in non-melanoma skin cancer. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010;24:505-512.
224. Casas A, Di Venosa G, Hasan T, et al. Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. *Curr Med Chem.* 2011;18:2486-2515.
218. Madan V, West CA, Murphy JV, et al. Sequential treatment of giant basal cell carcinomas. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2009;62:e368-372.
225. Baguley BC. Multiple drug resistance mechanisms in cancer. *Mol Biotechnol.* 2010;46:308-316.
219. Horn M, Wolf P, Wulf HC, et al. Topical methyl aminolaevulinate photodynamic therapy in patients with basal cell carcinoma prone to complications and poor cosmetic outcome with
226. Bagazgoitia L, Cuevas Santos J, Juarranz A, et al. Photodynamic therapy reduces the histological features of actinic damage and the expression of early oncogenic markers. *Br J Dermatol.* 2011;165:144-151.

227. Yang SH, Andl T, Grachtchouk V, et al. Pathological responses to oncogenic Hedgehog signaling in skin are dependent on canonical Wnt/beta3-catenin signaling. *Nat Genet.* 2008;40:1130-1135.
228. McCubrey JA, Steelman LS, Kempf CR, et al. Therapeutic resistance resulting from mutations in Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR signaling pathways. *J Cell Physiol.* 2011;226:2762-2781.
229. Weyergang A, Selbo PK, Berg K. Sustained EKR inhibition by EGFR targeting therapies is a predictive factor for synergistic cytotoxicity with PDT as neoadjuvant therapy. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2013;1830:2659-2670.
230. Szeimies RM, Morton CA, Sidoroff A, et al. Photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer. *Acta Derm Venereol.* 2005;85:483-490.
231. Morton C, Szeimies RM, Sidoroff A, et al. European dermatology forum guidelines on topical photodynamic therapy. *Eur J Dermatology.* 2015;25:296-311.
232. Sieroń A, Kawczyk-Krupka A, Wojciech Cebula MA, et al. Photodynamic therapy (PDT) using topically applied δ -aminolevulinic acid (ALA) for the treatment of malignant skin tumors. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2004;1:311-317.
233. Perona R, Sánchez-Pérez I. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Br J Cancer.* 2004;90:573-577.
234. Casas A, Perotti C, Ortel B, et al. Tumor cell lines resistant to ALA-mediated photodynamic therapy and possible tools to target surviving cells. *Int J Oncol.* 2006;29:397-405.
235. <http://ocw.um.es/cc.-de-la-salud/citologia-e-histologia-veterinaria/material-de-clase-1/tema9-tejido-conectivo-ii.pdf>.
236. Moon JS, Oh CH. Solar damage in skin tumors: Quantification of elastotic material. *Dermatology.* 2001;202:289-292.
237. Nagore E, Monteagudo C, Pinazo M, et al. [Protocol proposal for the histological report of the primary tumor in patients with cutaneous melanoma from the Task Force for Cutaneous Melanoma of the Valencian Community]. *Actas Dermosifiliogr.* 2007;98:459-465.
238. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 1970;172:902-908.
239. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer.* 2002;38:1564-1579.
240. Vermeulen P, Gasparini G, Fox S, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer.* 1996;32A:2474-2484.
241. Emami KH, Nguyen C, Ma H, et al. A small molecule inhibitor of beta-

- catenin/CREB-binding protein transcription [corrected]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:12682-12687.
242. So PL, Langston AW, Danialinia N, et al. Long-term establishment, characterization and manipulation of cell lines from mouse basal cell carcinoma tumors. *Exp Dermatol*. 2006;15:742-750.
243. Aszterbaum M, Epstein J, Oro A, et al. Ultraviolet and ionizing radiation enhance the growth of BCCs and trichoblastomas in patched heterozygous knockout mice. *Nat Med*. 1999;5:1285-1291.
244. Bielsa I, Soria X, Esteve M, et al. Population-based incidence of basal cell carcinoma in a Spanish Mediterranean area. *Br J Dermatol*. 2009;161:1341-1346.
245. Crowson AN. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Mod Pathol*. 2006;19 Suppl 2:S127-S147.
246. Perera E, Ganeswaran N, Staines C, et al. Incidence and prevalence of non-melanoma skin cancer in Australia: A systematic review. *Australas J Dermatol*. 2015;56:258-267.
247. Jung GW, Metelitsa AI, Dover DC, et al. Trends in incidence of nonmelanoma skin cancers in Alberta, Canada, 1988-2007. *Br J Dermatol*. 2010;163:146-154.
248. Bath-Hextall FJ, Perkins W, Bong J, et al. Interventions for basal cell carcinoma of the skin. *Cochrane database Syst Rev*. 2007;1:CD003412.
249. Calzavara-Pinton PG. Repetitive photodynamic therapy with topical-aminolevulinic acid as an appropriate approach to the routine treatment of superficial non-melanoma skin tumours. *J Photochem Photobiol B Biol*. 1995;29:53-57.
250. Peng Q, Warloe T, Berg K, et al. 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy - Clinical research and future challenges. *Cancer*. 1997;79:2282-2308.
251. Soler AM, Warloe T, Berner A, et al. A follow-up study of recurrence and cosmesis in completely responding superficial and nodular basal cell carcinomas treated with methyl 5-aminolevulinate-based photodynamic therapy alone and with prior curettage. *Br J Dermatol*. 2001;145:467-471.
252. Surrenti T, De Angelis L, Di Cesare A, et al. Efficacy of photodynamic therapy with methyl aminolevulinate in the treatment of superficial and nodular basal cell carcinoma: an open-label trial. *Eur J Dermatol*. 2007;17:412-415.
253. Fernández-Guarino M, Harto A, Pérez-García B, et al. Six years of experience in photodynamic therapy for Basal cell carcinoma: results and fluorescence diagnosis from 191 lesions. *J Skin Cancer*. 2014;2014:849248.
254. Shokrollahi K, Javed M, Aeuyung K, et al. Combined carbon dioxide laser with photodynamic therapy for nodular and superficial Basal cell carcinoma. *Ann Plast Surg*. 2014;73:552-558.
255. Naidenov N, Dencheva R, Tsankov N. Recurrence rate of basal cell carcinoma after topical aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Acta*

- Dermatovenereol Croat.* 2004;12:157-161.
256. Mosterd K, Krekels GA, Nieman FH, et al. Surgical excision versus Mohs' micrographic surgery for primary and recurrent basal-cell carcinoma of the face: a prospective randomised controlled trial with 5-years' follow-up. *Lancet Oncol.* 2008;9:1149-1156.
257. Soler A, Warloe T, Tausjø J, et al. Photodynamic therapy by topical aminolevulinic acid, dimethylsulphoxide and curettage in nodular basal cell carcinoma: a one-year follow-up study. *Acta Derm Venereol.* 1999;79:204-206.
258. Wang I, Bendsoe N, Klinteberg CA, et al. Photodynamic therapy vs. cryosurgery of basal cell carcinomas: results of a phase III clinical trial. *Br J Dermatol.* 2001;144:832-840.
259. Smucler R, Vlk M. Combination of Er:YAG laser and photodynamic therapy in the treatment of nodular basal cell carcinoma. *Lasers Surg Med.* 2008;40:153-158.
260. Lippert J, Šmucler R, Vlk M. Fractional carbon dioxide laser improves nodular basal cell carcinoma treatment with photodynamic therapy with methyl 5-aminolevulinate. *Dermatologic Surg.* 2013;39:1202-1208.
261. Roozeboom MH, Aardoom MA, Nelemans PJ, et al. Fractionated 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy after partial debulking versus surgical excision for nodular basal cell carcinoma: A randomized controlled trial with at least 5-year follow-up. *J Am Acad Dermatol.* 2013;69:280-287.
262. Peng Q, Soler A, Warloe T, et al. Selective distribution of porphyrins in skin thick basal cell carcinoma after topical application of methyl 5-aminolevulinate. *J Photochem Photobiol B.* 2001;62:140-145.
263. Li Q, Gao T, Jiao B, et al. Tumor thickness predicts long-term complete response of facial basal cell carcinomas in Asian skin types IV/V treated with methyl aminolaevulinate photodynamic therapy. *Photomed Laser Surg.* 2011;29:501-507.
264. Morton C, MacKie R, Whitehurst C, et al. Photodynamic therapy for basal cell carcinoma: effect of tumor thickness and duration of photosensitizer application on response. *Arch Dermatol.* 1998;134:248-249.
265. Christensen E, Mørk C, Skogvoll E. High and sustained efficacy after two sessions of topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for basal cell carcinoma: A prospective, clinical and histological 10-year follow-up study. *Br J Dermatol.* 2012;166:1342-1348.
266. Christensen E, Mjones P, Foss OA, et al. Pre-treatment evaluation of basal cell carcinoma for photodynamic therapy: Comparative measurement of tumour thickness in punch biopsy and excision specimens. *Acta Derm Venereol.* 2011;91:651-655.
267. Shing B, Dorelles A, Konnikov N, et al. Detection of High-Risk Histologic Features and Tumor Upstaging of Nonmelanoma Skin Cancers on Debulk Analysis: A Quantitative Systematic Review. *Dermatol Surg.* 2017;43:1003-

- 1011.
268. Sng J, Koh D, Siong WC, et al. Skin cancer trends among Asians living in Singapore from 1968 to 2006. *J Am Acad Dermatol*. 2009;61:426-432.
269. Shah S, Alster TS. Laser treatment of dark skin: An updated review. *Am J Clin Dermatol*. 2010;11:389-397.
270. Kaviani A, Ataie-Fashtami L, Fateh M, et al. Photodynamic therapy of head and neck basal cell carcinoma according to different clinicopathologic features. *Lasers Surg Med*. 2005;36:377-382.
271. Gracia Cazaña T, González S, Juarranz A, et al. Methyl-aminolevulinatate Photodynamic Therapy combined with curettage debulking for pigmented Basal Cell Carcinoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2017;33: 228-232.
272. Lucena SR, Salazar N, Gracia-Cazaña T, et al. Combined treatments with photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer. *Int J Mol Sci*. 2015;16:25912-25933.
273. Lovatt TJ, Lear JT, Bastrilles J, et al. Associations between ultraviolet radiation, basal cell carcinoma site and histology, host characteristics, and rate of development of further tumors. *J Am Acad Dermatol*. 2005;52:468-473.
274. Hamby R, Mansoor N, Quinlan C, et al. Topical Photodynamic Therapy for Primary Bowen's Disease and Basal Cell Carcinoma - Optimising Patient Selection. *Br J Dermatol*. 2016;Dec 27. doi: 10.1111/bjd.15281.
275. Collier NJ, Ali FR, Lear JT. No age-related decline in efficacy of photodynamic therapy for treatment of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2015;173:1564-1565.
276. Lindberg-Larsen R, Sølvsten H, Kragballe K. Evaluation of recurrence after photodynamic therapy with topical methylaminolevulinatate for 157 basal cell carcinomas in 90 patients. *Acta Derm Venereol*. 2012;92:144-147.
277. Cabete J, Rafael M, Cravo M, et al. Long-term recurrence of nonmelanoma skin cancer after topical methylaminolevulinatate photodynamic therapy in a dermatology department. *An Bras Dermatol*. 2015;90:846-850.
278. Basset-Seguin N, Baumann Conzett K, Gerritsen MJP, et al. Photodynamic therapy for actinic keratosis in organ transplant patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013;27:57-66.
279. Wlodek C, Ali FR, Lear JT. Use of photodynamic therapy for treatment of actinic keratoses in organ transplant recipients. *Biomed Res Int*. 2013;2013:349526.
280. Ulrich C, Kanitakis J, Stockfleth E, et al. Skin cancer in organ transplant recipients--where do we stand today? *Am J Transplant*. 2008;8:2192-2198.
281. Hartevelt M, Bavinck J, Kootte A, et al. Incidence of skin cancer after renal transplantation in The Netherlands. *Transplantation*. 1990;49:506-509.
282. Dragieva G, Hafner J, Dummer R, et al. Topical photodynamic therapy in the

- treatment of actinic keratoses and Bowen's disease in transplant recipients. *Transplantation*. 2004;77:115-121.
283. Perrett C, Tan S, Cerio R, et al. Treatment of basal cell carcinoma with topical methylaminolaevulinate photodynamic therapy in an organ-transplant recipient. *Clin Exp Dermatol*. 2006;31:146-147.
284. Guleng GE, Helsing P. Photodynamic therapy for basal cell carcinomas in organ-transplant recipients. *Clin Exp Dermatol*. 2012;37:367-369.
285. Castano A, Mroz P, Hamblin M. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:535-545.
286. Brito C, Resende C, Oliveira P. A 10-Year Retrospective Analysis of Methyl Aminolevulinate Photodynamic Therapy Consultation at the Hospital de Braga. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2016;6:265-272.
287. Kuijpers D, Thissen M, Neumann M. Basal cell carcinoma: treatment options and prognosis, a scientific approach to a common malignancy. *Am J Clin Dermatol*. 2002;3:247-259.
288. Newman J, Leffell D. Correlation of embryonic fusion planes with the anatomical distribution of basal cell carcinoma. *Dermatol Surg*. 2007;33:957-964.
289. Fiechter S, Skaria A, Nievergelt H, et al. Facial basal cell carcinomas recurring after photodynamic therapy: A retrospective analysis of histological subtypes. *Dermatology*. 2012;224:346-351.
290. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2013;13:714-726.
291. Al-Dimassi S, Abou-Antoun T, El-Sibai M. Cancer cell resistance mechanisms: a mini review. *Clin Transl Oncol*. 2014;16:511-516.
292. Madan V, Hoban P, Strange RC, et al. Genetics and risk factors for basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2006;154 Suppl:5-7.
293. Prignano F, Lotti T, Spallanzani A, et al. Sequential effects of photodynamic treatment of basal cell carcinoma. *J Cutan Pathol*. 2009;36:409-416.
294. De Bruijn HS, Brooks S, Van Der Ploeg-Van Den Heuvel A, et al. Light fractionation significantly increases the efficacy of photodynamic therapy using BF-200 ALA in normal mouse skin. *PLoS One*. 2016;11:1-20.
295. De Vrijlder HC, Sterenberg HJ, Neumann HA, et al. Light fractionation significantly improves the response of superficial basal cell carcinoma to aminolaevulinic acid photodynamic therapy: Five-year follow-up of a randomized, prospective trial. *Acta Derm Venereol*. 2012;92:641-647.
296. Rittenhouse-Diakun K, Van Leengoed H, Morgan J, et al. The Role Of Transferrin Receptor (CD71) In Photodynamic Therapy Of Activated And Malignant Lymphocytes Using The Heme Precursor -Aminolevulinic Acid (ALA). *Photochem Photobiol*. 1995;61:523-528.

297. Azimi F, Scolyer RA, Rumcheva P, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*. 2012;30:2678-2683.
298. Talmadge JE. Immune cell infiltration of primary and metastatic lesions: Mechanisms and clinical impact. *Semin Cancer Biol*. 2011;21:131-138.
299. Ozawa M, Baribault H, Kemler R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J*. 1989;8:1711-1717.
300. Ciurea ME, Cernea D, Georgescu CC, et al. Expression of CXCR4, MMP-13 and β -catenin in different histological subtypes of facial basal cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*. 2013;54:939-951.
301. Oh ST, Kim HS, Yoo NJ, et al. Increased immunoreactivity of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and β -catenin in high-risk basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2011;165:1197-1204.
302. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:161-174.
303. Fukumaru K, Yoshii N, Kanzaki T, et al. Immunohistochemical comparison of β -catenin expression by human normal epidermis and epidermal tumors. *J Dermatol*. 2007;34:746-753.
304. Brinkhuizen T, van den Hurk K, Winnepenninckx VJ, et al. Epigenetic Changes in Basal Cell Carcinoma Affect SHH and WNT Signaling Components. *PLoS One*. 2012;7:e51710.
305. Herren B, Levkau B, Raines EW, et al. Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases. *Mol Biol Cell*. 1998;9:1589-1601.
306. Espada J, Perez-Moreno M, Braga VM, et al. H-Ras activation promotes cytoplasmic accumulation and phosphoinositide 3-OH kinase association of β -catenin in epidermal keratinocytes. *J Cell Biol*. 1999;146:967-980.
307. El-Bahrawy M, El-Masry N, Alison M, et al. Expression of beta-catenin in basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2003;148:964-970.
308. Ma C, Shi L, Huang Y, et al. Nanoparticle delivery of Wnt-1 siRNA enhances photodynamic therapy by inhibiting epithelial-mesenchymal transition for oral cancer. *Biomater Sci*. 2017;5:494-501.
309. Sullivan KD, Gallant-Behm CL, Henry RE, et al. The p53 circuit board. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2012;1825:229-244.
310. Xie J. Molecular biology of basal and squamous cell carcinomas. *Adv Exp Med Biol*. 2008;624:241-251.
311. Burnworth B, Arendt S, Muffler S, et al. The multi-step process of human skin carcinogenesis: A role for p53, cyclin

- D1, hTERT, p16, and TSP-1. *Eur J Cell Biol.* 2007;86:763-780.
312. Stratigos a J, Kapranos N, Petrakou E, et al. Immunophenotypic analysis of the p53 gene in non-melanoma skin cancer and correlation with apoptosis and cell proliferation. *J Eur Acad Dermatol Venerol.* 2005;19:180-186.
313. Riesenber g R, Fuchs C, Kriegmair M. Photodynamic effects of 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin on human bladder carcinoma cells in vitro. *Eur J Cancer.* 1996;32:328-334.
314. Gallegos ER, Deleón Rodríguez I, Martínez Guzmán LA, et al. In vitro study of biosynthesis of protoporphyrin IX induced by delta-aminolevulinic acid in normal and cancerous cells of the human cervix. *Arch Med Res.* 1999;30:163-170.
315. Krieg RC, Fickweiler S, Wolfbeis OS, et al. Cell-type specific protoporphyrin IX metabolism in human bladder cancer in vitro. *Photochem Photobiol.* 2000;72:226-233.
316. Fritsch C, Abels C, Goetz AE, et al. Porphyrins preferentially accumulate in a melanoma following intravenous injection of 5-aminolevulinic acid. *Biol Chem.* 1997;378:51-57.
317. Navone NM, Polo CF, Frisardi AL, et al. Heme biosynthesis in human breast cancer-mimetic "in vitro" studies and some heme enzymic activity levels. *Int J Biochem.* 1990;22:1407-1411.
318. Orringer JS, Hammerberg C, Hamilton T, et al. Molecular effects of photodynamic therapy for photoaging. *Arch Dermatol.* 2008;144:1296-1302.
319. Anand S, Rollakanti K, Brankov N, et al. Fluorouracil enhances photodynamic therapy of squamous cell carcinoma via a p53 - independent mechanism that increases protoporphyrin IX levels and tumor cell death. *Mol Cancer Ther.* 2017;16:1092-1101.320. Brash DE. Roles of the transcription factor p53 in keratinocyte carcinomas. *Br J Dermatol.* 2006;154 Suppl:8-10.
321. Muller PAJ, Vousden KH. Mutant p53 in cancer: New functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell.* 2014;25:304-317.
322. Biegling KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer.* 2014;14:359-370.
323. Sznarkowska A, Maleńczyk K, Kadziński L, et al. Targeting of p53 and its homolog p73 by protoporphyrin IX. *FEBS Lett.* 2011;585:255-260.
324. Kaeser MD, Pebernard S, Iggo RD. Regulation of p53 stability and function in HCT116 colon cancer cells. *J Biol Chem.* 2004;279:7598-7605.
325. Zawacka-Pankau J, Issaeva N, Hossain S, et al. Protoporphyrin IX Interacts with Wild-type p53 Protein in Vitro and Induces Cell Death of Human Colon Cancer Cells in a p53-dependent and - independent Manner. *J Biol Chem.* 2007;282:2466-2472.
326. Fisher A, Danenberg K, Banerjee D, et al. Increased photosensitivity in HL60 cells expressing wild-type p53. *Photochem Photobiol.* 1997;66:265-270.

327. Fisher AMR, Ferrario A, Rucker N, et al. Photodynamic therapy sensitivity is not altered in human tumor cells after abrogation of p53 function. *Cancer Res.* 1999;59:331-335.
328. Whitacre CM, Feyes DK, Satoh T, et al. Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4 of SW480 human colon cancer xenografts in athymic mice. *Clin Cancer Res.* 2000;6:2021-2027.

J



PUBLICACIONES

J.1 REVISTAS CIENTÍFICAS

PUBLICADOS

Combined Treatments with Photodynamic Therapy for Non-Melanoma Skin Cancer. Lucena SR, Salazar N, Gracia-Cazaña T, Zamarrón A, González S, Juarranz Á, Gilaberte Y. *Int J Mol Sci.* 2015;16:25912-33.

Actualización en el procedimiento clínico de la Terapia Fotodinámica en Dermatología. Gracia Cazaña T, Gilaberte Y. *Monogr Dermatol.* 2015; 28 (Supl.1): 23-26.

Clinicopathological features of Bowen's disease resistance to methyl aminolevulinate photodynamic therapy. Gracia-Cazaña T, Vera-Alvarez J, Juarranz A, Pastushenko I, Salazar N, Gonzalez S, Gilaberte Y. *J Invest Dermatol.* 2015 135: S99-S105

Resistance of Nonmelanoma Skin Cancer to Nonsurgical Treatments. Part II: Photodynamic Therapy, Vismodegib, Cetuximab, Intralesional Methotrexate, and Radiotherapy. Gracia-Cazaña T, Salazar N, Zamarrón A, Mascaraque M, Lucena SR, Juarranz Á. *Actas Dermosifiliogr.* 2016;107:740-750.

Resistance of Nonmelanoma Skin Cancer to Nonsurgical Treatments. Part I: Topical Treatments. Gracia-Cazaña T, González S, Gilaberte Y. *Actas Dermosifiliogr.* 2016;107:730-739.

Clinicopathological features of Bowen's disease resistance to methyl aminolevulinate photodynamic therapy. Gracia-Cazaña T, Salazar N, Vera-Alvarez J, Aguilera J, López-Navarro N, Herrera-Ceballos E, Juarranz A, Gonzalez S, Gilaberte Y. *J Am Acad Dermatol.* 2017;Suppl (1):AB75.

Methyl aminolevulinate photodynamic therapy combined with curettage debulking for pigmented basal cell carcinoma. Gracia-Cazaña T, González S, Juarranz A, Gilaberte Y. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2017 May 13. doi: 10.1111/phpp.12313. [Epub ahead of print].

Photodynamic Therapy: Influence of Clinical and Procedure Variables on Treatment Response in Basal Cell Carcinoma and Bowen Disease. Gracia-

Cazaña T, Mascaraque M, Salazar N, Vera-Álvarez J, Pilar Frías M, González S, Juarranz Á, Gilaberte Y. Acta Derm Venereol. 2017 Aug 1. doi: 10.2340/00015555-2756. [Epub ahead of print].

Clinical, histological, and immunohistochemical markers of resistance to Methylaminolevulinate Photodynamic therapy in Bowen's disease. Gracia-Cazaña T, Salazar N, Vera-Álvarez J, Aguilera J, López-Navarro N, Herrera-Ceballos E, González S, Juarranz A, Gilaberte Y. Br J Dermatol. 2017 Sep 8. doi: 10.1111/bjd.15965. [Epub ahead of print].

ACEPTADOS

Comparative study of the clinical, histological, and biological characteristics of squamous cell carcinomas in areas previously treated with photodynamic therapy. Gracia-Cazaña T, Salazar N, Vera-Álvarez J, González S, Juarranz A, Gilaberte Y. European Journal of Dermatology..

J.2 COMUNICACIONES EN CONGRESOS

Variables clínicas, histológicas e inmunohistoquímicas relacionadas con la resistencia de la enfermedad de bowen a la terapia fotodinámica. Gracia-Cazaña T, Vera-Álvarez J, Juarranz A, Pastushenko I, Salazar N, González S, Roca MJ, Gilaberte Y. 43 Congreso Nacional de AEDV. 13-16 Mayo del 2015. Sevilla.

Variables clínicas, histológicas e inmunohistoquímicas relacionadas con la resistencia de la enfermedad de bowen a la terapia fotodinámica con metilaminolevulinato. Gracia-Cazaña T, Vera-Álvarez J, Juarranz A, Pastushenko I, Salazar N, González S, Roca MJ, Gilaberte Y. 30 Reunión del grupo Español de Fotobiología. Nuevos caminos para la fotobiología. 5-6 Febrero del 2016. Barcelona.

Estudio comparativo de las características clinicopatológicas y biológicas de carcinomas escamosos aparecidos sobre un área previamente tratada con TFD o no. Gracia-Cazaña T, Vera-Álvarez J, Salazar N, Lucena SR, González S, Juarranz A, Gilaberte Y. 44 Congreso Nacional de la AEDV. 1- 4 Junio del 2016. Zaragoza.

Comparative study about the clinical, histological and biological characteristics of squamous cell carcinomas which appear on areas treated with prior PDT versus those not. Gracia-Cazaña T, Vera-Alvarez J, Roca MJ, Zamarrón A, Gonzalez

S, Juarranz A, Gilaberte Y. 25th Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology. 28 Septiembre-2 Octubre del 2016. Viena, Austria.

Estudio de las variables clínico-patológicas relacionadas con la resistencia de la enfermedad de Bowen a la terapia fotodinámica con metilaminolevulinato.

Gracia-Cazaña T, Aguilera J, Salazar N, López Navarro N, Herrera Ceballos E, Juarranz A, González S, Gilaberte Y. XXIX Reunión del Grupo Español de Grupo Español de Dermatología Quirúrgica, Láser y Oncología cutánea de la Academia Española de Dermatología y Venereología. 11-12 Noviembre del 2016. León.

Study of clinical, histological and immunohistochemical markers of resistance of bowen disease to PDT.

Gracia-Cazaña T, Salazar N, Aguilera J, Mascaraque M, López-Navarro N, Herrera- Ceballos E, González S, Juarranz A, Gilaberte Y The European Society For Photodynamic Therapy. 10-11 Febrero del 2017. Munich, Alemania.

Estudio de las variables del carcinoma basocelular que influyen en la respuesta a la terapia fotodinámica con metil-aminolevulínico.

Gracia-Cazaña T, Vera-Álvarez J, Mascaraque M, Lucena S, Zamarrón A, González S, Juarranz A, Gilaberte Y. 45 Congreso Nacional de la AEDV. 10-13 de Mayo del 2017. Madrid.

Clinical Features of pigmented basal cell carcinoma resistant to photodynamic therapy.

Gracia-Cazaña T, Salazar N, Vera-Alvarez J, Mascaraque M, Gonzalez S, Juarranz A, Gilaberte Y. 14th Spring Symposium of the European Academy of Dermatology and Venereology. 25-28 Mayo del 2017. Bruselas, Belgica.

K



ANEXO I



Etiqueta del Paciente

TERAPIA FOTODINÁMICA

Fecha:

Enfermedad Dermatológica:

Biopsia:

- No
- Previa al tratamiento
- Por curetaje

Vaselina previa: Sí ☐ No ☐

Sangrado en curetaje:

- Escaso
- Medio
- Abundante

Analgesia Iluminación: Sí ☐ No ☐

Fluorescencia antes:

- Fucsia selectivo
- Rosado más marcado
- Todo rosado (no diferencia)
- Otros

Interrupción de la iluminación: Sí ☐ No ☐

- Número de veces
- Duración global de la interrupción

Dolor:

- Nulo o leve
- Moderado
- Intenso
- Muy intenso

Fluorescencia después:

- Mayor que la anterior
- Igual a la anterior
- Menor que la anterior

Enrojecimiento:

- Leve
- Moderado
- Intenso

***OBSERVACIONES**

TERAPIA FOTODINÁMICA 2 sesión

Fecha:

Estado de la lesión:

- Costra negruzca
- Eritema
- Otros

Analgesia Iluminación: Sí ☐ No ☐

Fluorescencia antes:

- Fucsia selectivo
- Rosado más marcado
- Todo rosado (no diferencia)
- Otros

Interrupción de la iluminación: Sí ☐ No ☐

- Número de veces
- Duración global de la interrupción

Dolor:

- Nulo o leve
- Moderado
- Intenso
- Muy intenso

Fluorescencia después:

- Mayor que la anterior
- Igual a la anterior
- Menor que la anterior

Enrojecimiento:

***OBSERVACIONES**

- Leve
- Moderado
- Intenso

RESULTADO

Fecha:

- No hay lesión
- Eritema
- Hiperpigmentación
- Lesión residual
- Observaciones

The background features a complex network of thin, overlapping teal and blue lines that create a sense of movement and connectivity. In the center, there is a detailed molecular structure composed of interconnected hexagonal rings, resembling a carbon lattice or a complex organic molecule. The structure is rendered in a light teal color, blending with the background's color scheme.

SUPLEMENTO: ARTÍCULOS PUBLICADOS SOBRE RESISTENCIAS A TFD

Review

Combined Treatments with Photodynamic Therapy for Non-Melanoma Skin Cancer

Silvia Rocío Lucena ¹, Nerea Salazar ¹, Tamara Gracia-Cazaña ^{2,3}, Alicia Zamarrón ¹, Salvador González ^{4,5}, Ángeles Juarranz ^{1,†} and Yolanda Gilaberte ^{3,6,†,*}

¹ Department of Biology, Faculty of Sciences, Autónoma University, 28049 Madrid, Spain; E-Mails: silvialucenablas@gmail.com (S.R.L.); nerea.salazar@estudiante.uam.es (N.S.); aliszm@gmail.com (A.Z.); angeles.juarranz@uam.es (A.J.)

² Unit of Dermatology, Barbastro Hospital, 22300 Barbastro, Spain; E-Mail: tamara_gracia@hotmail.com

³ Aragón Health Sciences Institute, 50009 Zaragoza, Spain

⁴ Department of Medicine and Medical Divisions, University of Alcalá, 28801 Madrid, Spain; E-Mail: gonzals6@mskcc.org

⁵ Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY 10022, USA

⁶ Unit of Dermatology, San Jorge Hospital, 22005 Huesca, Spain

† These authors contributed equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: ygilaberte@salud.aragon.es; Tel.: +34-974-247-000 (ext. 524138).

Academic Editor: Michael R. Hamblin

Received: 16 August 2015 / Accepted: 20 October 2015 / Published: 28 October 2015

Abstract: Non-melanoma skin cancer (NMSC) is the most common form of cancer in the Caucasian population. Among NMSC types, basal cell carcinoma (BCC) has the highest incidence and squamous cell carcinoma (SCC) is less common although it can metastasize, accounting for the majority of NMSC-related deaths. Treatment options for NMSC include both surgical and non-surgical modalities. Even though surgical approaches are most commonly used to treat these lesions, Photodynamic Therapy (PDT) has the advantage of being a non-invasive option, and capable of field treatment, providing optimum cosmetic outcomes. Numerous clinical research studies have shown the efficacy of PDT for treating pre-malignant and malignant NMSC. However, resistant or recurrent tumors appear and sometimes become more aggressive. In this sense, the enhancement of PDT effectiveness by combining it with other therapeutic modalities has become an interesting field in NMSC

research. Depending on the characteristics and the type of tumor, PDT can be applied in combination with immunomodulatory (Imiquimod) and chemotherapeutic (5-fluorouracil, methotrexate, diclofenac, or ingenol mebutate) agents, inhibitors of some molecules implicated in the carcinogenic process (COX2 or MAPK), surgical techniques, or even radiotherapy. These new strategies open the way to a wider improvement of the prevention and eradication of skin cancer.

Keywords: photodynamic therapy; methyl-aminolevulinic acid; aminolevulinic acid; actinic keratosis; basal cell carcinoma; Bowen disease; squamous cell carcinoma; tumor resistance

1. Skin Cancer

Skin cancer is a main common form of cancer, with non-melanoma types (NMSC), basal cell carcinoma (BCC) and squamous cell carcinoma (SCC), being the most frequent types [1,2]. Although death from NMSC is rare, treatment of NMSC results in a considerable burden on the health-care system [3–5].

One of the most important etiologic factors is sun exposure, particularly, ultraviolet radiation (UVR) and especially ultraviolet B (UVB). In fact, exposure to UVR is associated with approximately 90% of NMSCs. This is particularly applicable to people who have lighter complexion (skin types I–III) [6] and some predisposing genetic factors [7].

BCC is the most common cancer in fair skinned individuals and its incidence is still rising [6]. The incidence is also increasing among younger people (<40 years), however the average age of first diagnosis is 60. Metastasis is unusual (incidence of 0.0028%–0.55%), however, the invasive growth pattern can destroy vital structures [8]. It mainly appears in the chronically photoexposed skin, even though superficial BCC is also frequent on the trunk. Other risk factors include skin phototype, immunosuppression, and hereditary disorders such as nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin-Goltz syndrome) and xeroderma pigmentosum. Recently, it has been proposed that 90% of superficial BCC evolve from interfollicular epidermal basal stem cells, whereas the rest of types evolve from hair follicle (Figure 1) [9].

According to both clinical and histological criteria, the most common subtypes of BCC are nodular, infiltrative (sclerodermiform and micronodular) and multicentric-superficial. Aggressive ulcerative and destructive forms and pigmented BCCs are other variants [6,8].

SCC derives from the keratinocytes of the spinous layer of the epidermis (Figure 1). Although it has a lower frequency in relation to BCC, SCC is more aggressive and has a major capacity of metastasis, thus being responsible for most deaths associated with NMSC. It also appears in photoexposed areas such as the head, neck and extremities and its incidence increases with age [4,10–13]. Most cases of SCC derive from chronic UV-radiation exposure being the premalignant lesion actinic keratosis (AK). Otherwise, Bowen Disease (BD) or *SCC in situ*, could evolve into an invasive SCC (iSCC) in some cases. In contrast to BD, in iSCC atypical keratinocytes are present beyond the basement membrane, in the dermis or deeper, and it could metastasize. On the other hand, SCC is the most common malignant tumor in transplant patients, who present multiple lesions and with more aggressive behavior than in the general population [14].

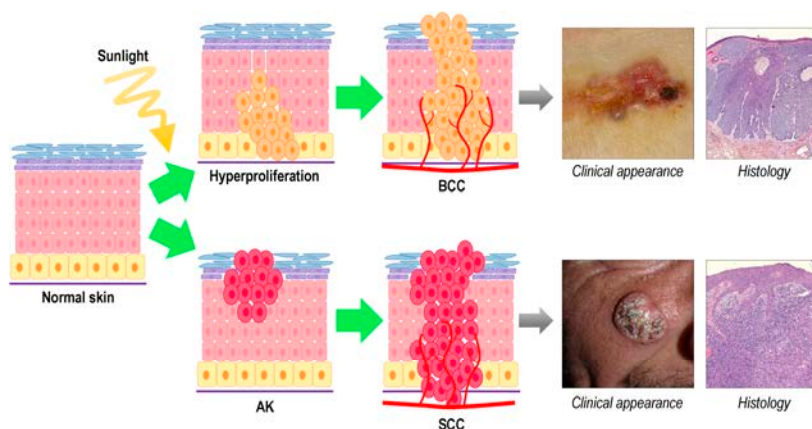


Figure 1. Formation process, clinical and histological appearance of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma.

AK is a cutaneous lesion and develops mostly in fair skinned patients susceptible to solar damage. Its frequency is directly related to cumulative exposure of UV, and therefore, usually develops on sun-exposed areas (face, forearms, upper back and legs). AK is often multiple and usually found in an area of “cancerization field” that defines the skin around AK, which provides the basis for clonal expansion of genetically altered neoplastic cells [4]. SCC and AK essentially represent the same disease process but at different stages of evolution [15,16]. It is estimated that between 5% and 10% of AK progress to BD or SCC [6,17].

2. Photodynamic Therapy for Non-Melanoma Skin Cancer

There are several classical therapies for the different types of NMSC. In general, the most widely extended is surgery but other treatments are: (1) for BCC curettage and electrodesiccation, radiotherapy, cryotherapy, photodynamic therapy (PDT), laser, topical (imiquimod and 5-fluorouracil), and systemic treatments (vismodegib and sonidegib [18]; and (2) for SCC cryosurgery, electrosurgery and radiotherapy; topical treatments such as 5-fluorouracil and imiquimod or PDT are only recommended for SCC *in situ*. Regarding AK cryotherapy, PDT, topical 5-fluorouracil (5%, 1%, 0.5%), imiquimod (5%, 3.75%), ingenol mebutate (0.05%, 0.015%), diclofenac, topical retinoids, chemical peels, electrosurgery or lasers are used to treat isolated or multiple lesions [19].

Among all the alternative treatments used for non-melanoma skin cancer, we highlight PDT not only because of its high efficacy (strength of recommendation A, quality of evidence I for AK, BD and BCC) but also for its good cosmetic outcome [1,6,20–25]. As it has those advantages, PDT treatment has been extensively developed as a new modality and an alternative to classical ones such as surgery, radiation or chemotherapy, being particularly suitable for treating multiple lesions and field cancerization [26]. PDT is more beneficial in those patients in which size, site or number of lesions limit the efficacy and/or acceptability of conventional therapies [27].

This treatment is comparatively non-invasive and is based on the interaction of three elements: a photosensitizing compound, light of an adequate wavelength and oxygen. When the photosensitizer (PS) is activated by light, it triggers a photochemical reaction by which singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and other reactive oxygen species (ROS) are produced and selectively kill cancer cells [27–30]. Anti-tumoral effects of PDT derive from three principal mechanisms: direct cytotoxicity on cancer cells, indirect effects consequence of damage to the tumor vasculature, and the activation of the immune response.

The principal compounds used in cutaneous oncology are: 5 aminolevulinic acid (ALA, Levulan® (Wilmington, DE, USA) and Ameluz® (Leverkusen, Germany) and its methylated derivate (MAL, Metvix® (Alby sur Cheran, France)) [27,31]. MAL is approved in Europe for the treatment of AK, BD, and for superficial and nodular (less than 2 mm of deepness) BCC, whereas ALA is only indicated for AK. ALA is a precursor of intermediate porphyrins of heme group biosynthesis, specifically of the photoactive compound Protoporphyrin IX (PpIX). ALA administration results in the production and selective accumulation of the PS PpIX in cancer cells. There are also some studies about the use of PDT for other skin cancer types such as lymphomas [26].

It has been reported that PDT exerts an anti-tumor immunological effect. This sometimes could be associated with an intense inflammatory response, characterized by an increase of cytokines and accumulation of leukocytes in targeted tumor areas, favoring tumor destruction. On the other hand, Evangelou *et al.* [32] revealed that MAL-PDT of BCC reduces local epidermal Langerhans cells. Thus, this suppression of the skin immune response might potentially result in a less effective antitumor response.

2.1. Limitations of Photodynamic Therapy (PDT)

Among the benefits of MAL-PDT are its high rates of complete response (CR); in BCC, 91% at three months and 76% at five years of follow up, and in BD, 86% to 93% at three months and 68% to 71% at 24 months [33]. Other advantages include the possibility of combining PDT with other therapies and repeat the process as needed with an excellent cosmetic result and greater satisfaction of the patient. However its limitations are, pain during illumination [34,35], the penetration of the photosensitizer and light, and the possibility of tumor resistance, occasionally found in those refractory to treatment [36,37]. Next, we describe the factors that may limit the response to PDT.

Pain is the most common adverse effect in PDT and it is one of the limiting factors in some patients. Such pain seems due to the combination of heat and intense nerve stimulation. While between 60% and 80% of patients consider the pain light to moderate, 20% describe it as intense [34]. It has been observed that this technique is less painful when using MAL than ALA, being pre-treatment PpIX fluorescence and lesion diameter associated with pain [36].

The intensity of pain is related to the area of treatment, the amount of pain receptor nerves at the tumor site (more in head, hands and perineum), male patients, phototype and in the second cycle of PDT treatment [33,37]. Furthermore, it has been hypothesized that pain could play a role in the pathogenesis of blood pressure increase after MAL-PDT, including acute postoperative hypertension and hypertensive crisis [38].

Tumoral thickness is the best-studied limiting factor of PDT for BCC. McKay *et al.* [39] described those tumors thicker than 0.4 mm had more risk of recurrence and, on the other hand, PDT is not

recommended for nodular BCC deeper than 2 mm [24]. However, for superficial BCC no association was found between thickness and adnexal extension and treatment failure [40]. To reduce the impact of this limitation, different techniques have been used to diminish the tumor size or to increase the penetration of the photosensitizer; Christensen *et al.* [41] showed that a deep curettage which, reduced the tumor thickness by 50%, improved the outcome in patients following PDT in BCC with mean thickness of 2.3 mm (CR at three months of 93%).

Some histological subtypes of BCC are more resistant to PDT than others. Pigmented BCC responds worse due to light absorption by melanin [42]; the high density of collagen and the cords of cells infiltrating the connective tissue limits the penetration of PS in the morphoeic and infiltrative variants of BCC, respectively [42]. For these reasons, PDT is not indicated in these subtypes of tumor.

Hyperkeratosis is one of the principal inconveniences for the photosensitizer penetration. The use of keratolytic agents or curettage before PDT is mandatory for a successful PDT [28].

The size of the tumor is a limiting factor for some authors. Madan *et al.* found that giant superficial BCC [43] or those tumors over 4 cm in diameter respond worse to PDT [44,45]. However, there are more studies supporting that tumor diameter does not affect the outcome [46–50]. In BD, clinical guidelines consider PDT as a first line treatment, especially in big and multiple lesions [49,51,52]. Whereas some authors conclude that tumor diameter is not a predictor of final response, although it has been associated with tumor relapse [53], others found it a negative prognostic factor [54].

The site of the lesions could have a strong influence over PDT response. BCC located on the face/head has lower complete response rates compared to those on the trunk/neck region (at 24 months, 54% vs. 88%) [48]. If the tumor is present in the H zone of the face, regardless of size, the response is also reduced; considering also that this is a risk zone for BCC, PDT is not indicated in this area [48]. Regarding AK, lesions present on the limbs are more resistant to MAL-PDT than those located on the face/scalp [55,56]. Modern guidelines consider BD located on fingers as a limitation factor for the use of PDT [57].

Another factor that may limit the effectiveness of PDT can be patient's age, being more effective in younger patients [58]. Previous history of radiotherapy in the area has been also associated with less response of BCC [59].

2.2. Resistance to PDT

Resistance to traditional anti-cancer therapies (chemotherapy and radiotherapy) is the main cause of their failure, leading to tumor progression and poor clinical prognoses. Chemotherapy success is associated with factors related to the access of drugs to subcellular sites, cell-cycle kinetics and/or mutations [60–64]. Concerning PDT, efficacy mainly depends on the selective uptake of the photosensitizer by tumoral cells, oxygen levels, and irradiation dose. Although it is not well documented, PDT can also induce tumor cell resistance in patients [65–68].

As a response to PTD, some genes clearly addressed to cell death and others to its protection are expressed. The activation of these oxidative stress genes could contribute to a poor response to the treatment [69,70]. Some of the genes activated after PDT are nuclear factor K (NF-κB), mitogen-activated protein kinase (MAPK), protein kinase B (PKB/Akt), phosphoinositide-3 kinase (PI3K) and cyclooxygenase 2 (COX-2). The signaling mediated by MAPK is implicated in numerous

physiological processes in response to stress, like proliferation and cell death [71]. Otherwise, COX, which participates in prostaglandin synthesis (PGE), is related to the immunomodulatory responses development. The isoform COX-2 is implicated in inflammatory processes and in cancer through the synthesis of PEG2 overexpressed in premalignant and malignant situations of epithelial lesions. The expression of PEG2 is related to the activation of survival, proliferation and apoptosis inhibition signals mediated by MAPKs, PI3K/Akt. In the same way, the overexpression of COX-2 in NMSC has been described and can be considered as an early marker of actinic damage in carcinogenesis [72,73]. On the other hand, MAL-PDT, as has been said before, reduces local epidermal Langerhans cells [31].

The combination of diverse therapeutic modalities is one of the new strategies to enhance oncologic treatments. In order to overcome the limitations of PDT and to prevent the development of resistance, the application of PDT combined with coadjuvant therapies, without increasing the toxicity for the patient, is being widely investigated.

3. Combined Treatments with PDT in NMSC

NMSCs are treated mainly by surgery, but there are other therapies less invasive such as 5-fluorouracil, the immunomodulator imiquimod, the nonsteroidal anti-inflammatory diclofenac and other agents such as ingenol mebutate. However, occasionally after treatment, recurrence appears, so a better understanding of its causes would be essential to develop more effective therapies [74]. The combination of various therapeutic modalities is an interesting strategy in cancer management. Next, we will review the different treatments used in combination with PDT for NMSC (Figure 2).

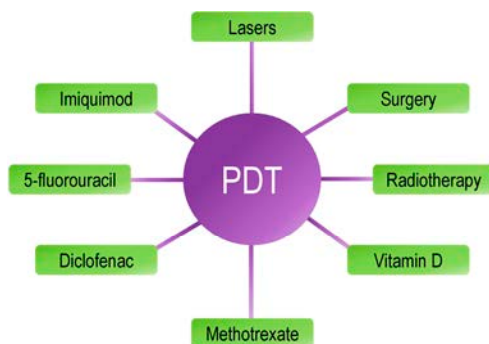


Figure 2. Treatments and procedures that have been combined with photodynamic therapy to treat non-melanoma skin cancer.

3.1. Actinic Keratosis

Table 1 summarizes AK studies combining PDT with other treatments. 5-fluorouracil (5-FU) induces cell cycle arrest and apoptosis and is used in the treatment of AK and superficial BCC twice-daily for two or more weeks [75]. In a study with 15 patients with facial AK applied 5-FU nightly for five days and underwent ALA-PDT on the sixth day. At one month and one year post-treatment, 90% of treated

AK had resolved [76]. Martin reported in 2011 [77] that the treatment with sequential 5-FU and ALA-PDT in three old men with AK, when compared with ALA-PDT alone, was more effective, minimized the recurrence of areas of field cancerization and improves the appearance of the skin.

Imiquimod 5% cream stimulates the innate immune response and is applied between twice and five times a week for 6 to 16 weeks, depending on whether it is being used for AK, or superficial BCC [75]. In a study from 2009 [78] it was demonstrated that ALA-PDT followed by imiquimod (twice a week for 16 weeks) was more effective than PDT alone. At month 12, the median lesion reduction was 89.9% in patients who were treated with combined therapy vs. 74.5% of PDT alone. Serra-Guillén *et al.* [79] also demonstrated that PDT and imiquimod was more efficacious than PDT alone, but more patients were satisfied with PDT than with the other two modalities. In a more recent study, three patients received one session of PDT plus imiquimod three days per week for one month, and those without complete response underwent a second four-week course. Two patients showed complete clinical clearance of AK [80].

Diclofenac is a non-steroidal anti-inflammatory drug that reduces the production of prostaglandins by inhibiting inducible COX-2. The approved treatment regimen for AK consists of twice-daily application for 60 to 90 days [75]. Akita *et al.* [81] showed a considerable expression of COX-2 in AK (15 of 25, 60%) and BD (13 of 17, 76%). In contrast, only one of 33 (3%) BCC was a COX-2 high expresser. Bagazgoitia *et al.* [82] also observed that COX-2 is overexpressed in AK and BD, and its expression could be correlated with the PDT response. In a study with 10 patients, the pretreatment with diclofenac plus ALA-PDT reduced the number of lesions compared to PDT alone after 12 months [83].

Ingenol mebutate appears to have multiple mechanisms of action, including direct cell death and a complex inflammatory response [75]. Berman *et al.* [84] carried out a study with 24 patients that were divided in two treatments with ALA-PDT, 1 ALA-PDT treatment and one course of ingenol mebutate daily for three consecutive days, or one course of ingenol mebutate alone. Subjects in the two ALA-PDT treatment group had a 97.5% mean reduction from the number of baseline AK; ALA-PDT plus ingenol mebutate gel reached 86.7% mean reduction; while subjects in the ingenol mebutate group had a 91.7% mean reduction.

Fractional laser produces small columns of thermal injury to the skin, which are known as microthermal zones (MTZs). These MTZs vary from one device to another. Some are nonablative dermal injuries only, whereas others are associated with ablative changes in the skin, causing both epidermal and dermal injury patterns. In this sense, Togsverd-Bo *et al.* [85] compared ablative fractional laser (AFL)-assisted daylight photodynamic therapy (AFL-dPDT) with daylight PDT (dPDT), conventional PDT (cPDT) and AFL alone (AFL) in field treatment of AK in organ-transplant recipients. Sixteen patients with a total of 542 AK were treated. Three months later, complete response rates were 74% using AFL-dPDT, 46% dPDT, 50% cPDT and 5% AFL.

Table 1. Clinical studies of combined treatments with photodynamic therapy for actinic keratoses.

PS (PDT)	Coadjuvant	n (Patients)	Results	Adverse Effects	Reference
ALA	5-fluorouracil	15	At 1 month and at 1 year post-PDT + 5-FU treatment, 90% of treated AKs had resolved in all but one patient.	Not reported	[76]
ALA	5-fluorouracil	3	PDT + 5-FU treatment is more effective, minimizes the recurrence of areas of field cancerization and improves the appearance of the skin, in comparison with PDT alone	Not reported	[77]
ALA	Imiquimod	3	At 7 and 11 months after PDT + imiquimod treatment, 2 patients showed complete clearance of AKs	Skin reactions such as severe erythema, scaling, and crusting	[80]
ALA	Imiquimod	25	At month 12, median lesion reduction was 89.9% after PDT + imiquimod and 74.5% after PDT	Severe local skin reactions in most participants: erythema, flaking, scaling and dryness	[78]
MAL	Imiquimod	105	Complete clinical response: 37.5% after PDT + imiquimod, 10% after PDT and 2.7% after imiquimod. Histological response (absence of AK): 84% after PDT + imiquimod, 55% after PDT and 79% after imiquimod. Complete clinicopathologic response: 34% after PDT + imiquimod, 10% after PDT and 2.7% after imiquimod	90% of patients who received PDT were very satisfied with treatment <i>versus</i> 61% of patients who received imiquimod	[79]
ALA	Diclofenac	10	At 12 months, significantly fewer AK were seen in the PDT + diclofenac group compared with PDT alone	Pain during PDT was greater in the PDT + Diclofenac group	[83]
ALA	Ingenol mebutate	24	Mean reduction of the number of AKs: 86.7% in PDT + ingenol group 97.5% in PDT group 91.7% in ingenol mebutate group	Not reported	[84]
MAL-PDT: conventional (cPDT) and daylight (dPDT)	Ablative Fractional Laser (AFL)	16	Complete response rates: 74% in AFL + dPDT group 46% in dPDT group 50% in cPDT group 5% in AFL group	Erythema and crusting were more intense following AFL-dPDT than dPDT or cPDT	[85]
ALA: aminolevulinic acid; MAL: methyl-aminolevulinate; PDT: photodynamic therapy; cPDT: conventional PDT; dPDT: daylight PDT; AFL: ablative fractional laser; AK: actinic keratosis; 5-FU: 5 fluorouracil.					

3.2. Squamous Cell Carcinoma

Table 2 summarizes the clinical studies combining PDT with other therapies for SCC. Although BD is probably the tumor with better response to PDT, some can show resistance or recurrence after PDT. Lu *et al.* [86] evaluated 13 cases of BD treated with ALA-PDT (three times) after surgery and there was no recurrence in one year. In addition, Sotiriou *et al.* [87] evaluated the combination of PDT plus imiquimod. They treated a man with a two-year history of BD on his face with two PDT sessions followed by application of imiquimod and complete clinical and histological response was achieved.

For decades radiotherapy has been a treatment option for NMSC when other modalities failed or could not be used. Nevertheless, the side effects of ionizing radiation are well known and the amount of radiation applied is limited [88]. Nakano *et al.* [89] selected four patients with BD that did not show complete remission or showed recurrence after ALA-PDT. Then, they were again treated with ALA-PDT followed by radiotherapy; the combination therapy was repeated every two to three days for a total of four treatments. All lesions disappeared and recurrence was not detected during 14 months.

Finally, Cai *et al.* [90] evaluated the efficacy of ALA-PDT in combination with CO₂ laser. Twenty-two lesions were randomized into two groups: 11 lesions were treated with ALA-PDT and CO₂ laser and 11 lesions with CO₂ laser alone. In the ALA-PDT + CO₂ laser group, eight out of 11 BD lesions showed complete remission, and only one recurred. In the control group, seven lesions out of 11 completely cleared and five recurred.

Most studies about PDT plus other therapeutic agent in SCC have been done in cellular mice models, because PDT is not recommended for invasive SCC. However, Lu *et al.* [86] evaluated the efficacy of ALA-PDT plus excision in five cases of SCC. All cases were treated with topical ALA-PDT (three times) after surgery. There was no recurrence in six months after treatment but two cases did one year later.

There are several *in vitro* studies combining ALA-PDT with determined compounds. For example the combination ALA-PDT with Nimesulide (COX-2 inhibitor) was determined on two SCC cell lines, HSC-2 and HSC-4, with different COX-2 expression. Nimesulide had an inhibitory effect on HSC-2 (COX-2 high expresser), but not on HSC-4 (COX-2 non-expresser). ALA-PDT showed an inhibitory effect on both cell lines. The combination of PDT with Nimesulide provoked a significant synergistic effect on the inhibition of cellular growth, especially in HSC-2 [81]. Ishida *et al.* [91] found that HSC-5 cells, another human SCC cell line, pretreated with etretinate (a retinoid) were more susceptible to ALA-PDT by enhanced accumulation of intracellular PpIX.

Methotrexate (MTX) is a chemotherapeutic agent that inhibits cell proliferation and triggers cellular differentiation. Preincubation of human skin carcinoma cells SCC13 and normal keratinocytes HEK1 with MTX followed by incubation with ALA significantly enhanced the intracellular porphyrin levels in the cells and therefore, PDT was synergistically enhanced by MTX treatment. These effects were also described in SKH-1 hairless mice tumors previously treated systemically with MTX to ALA-PDT [92].

Vitamin D is a pro-hormone synthesized in the keratinocytes in a reaction catalyzed by UV radiation, and it can also be taken from the diet. In the skin, the active form of vitamin D can be completely produced by the keratinocytes and contribute to maintain the quiescence of differentiated phenotype and inhibit modified signaling pathways in NMSC such as Wnt/ β -catenin and Hedgehog/Patched [93–95]. Cicarma *et al.* [96] demonstrated that a short course (24 h) of calcitriol pretreatment before MAL-PDT elevated the intracellular PpIX in A-431 cells. Furthermore, cell damage after exposure to blue light was

significantly higher in calcitriol treated cells. Increased photoinactivation correlated with higher levels of PpIX in the calcitriol-pretreated cells. Likewise, Anand *et al.* [97] using mouse models of SCC reported that calcitriol administered prior to ALA increased the efficacy of PDT. Anand *et al.* [98] also tested a possible strategy to overcome the problem of hypercalcemia by substituting natural dietary vitamin D3 for calcitriol. Oral D3 supplementation enhanced PpIX levels, and cell death in subcutaneous A431 tumors mediated by PDT. These results support the brief use of oral administration of cholecalciferol as a safe neoadjuvant to ALA-PDT. In BCC and UVB-induced SCC mouse models, they identified an increase in tumor-specific accumulation of PpIX due to vitamin D preconditioning of up to six-fold *in vivo*. In addition, increased expression of proliferation (42-fold) and differentiation (145-fold) markers was identified in BCCs, all leading to superior tumor destruction (18.3-fold) with the combination of both treatments, compared to ALA-PDT [99].

Furthermore, in our previous works, one of the factors that seemed related to the lack of response to PDT was the overexpression of EGFR [100]. For this reason, association of PDT with an EGFR blocker may help to reduce treatment resistance [101]. Weyergang *et al.* [102] evaluated the combination of PDT plus EGFR targeting drugs in A-431 cells, an EGFR positive cell line of human epidermoid skin carcinoma. PDT and Tyrphostin revealed synergistic cytotoxicity, whereas Erlotinib or Cetuximab induced an antagonistic effect on cell survival. Neoadjuvant EGFR targeting therapies and PDT induced a synergistic inhibition of ERK as well as synergistic cytotoxicity only when the EGFR targeting monotherapies caused a prolonged ERK inhibition.

3.3. Basal Cell Carcinoma

Different treatments have been combined with PDT to increase its efficacy and overcome resistances (Table 3). Jeremic *et al.* [103] treated 10 BCC and eight SCC previous to surgical excision; four BCC demonstrated a complete response after an average of two PDT treatments, whereas the remaining lesions demonstrated a partial response after three PDT sessions with a maximum reduction of the tumor area of 88%. These tumors were then excised with clear histologic margins without recurrence in one year. The results suggest that for those NMSC without a complete response to PDT, neoadjuvant PDT can substantially reduce tumor burden, allowing for less morbid surgical excisions with histologically clear margins. In another study, Torres *et al.* [104] showed that two PDT sessions, one week apart, reduced in 30%–50% the size of all tumors. After two and a half years, all patients remained without recurrence and the cosmetic outcome was considered very good. Lu *et al.* [86] also evaluated the efficacy of three sessions of ALA-PDT after the excision of 32 BCCs without recurrence in one year of follow-up.

Table 2. Clinical studies of combined treatments with photodynamic therapy for squamous cell carcinoma.

MODEL	Photosensitizer (PDT)	Co-Adjuvant	Results	Side Effects	Reference
Patients: 13 BD	ALA	Surgery	100% complete response. No recurrence in 1 year	Moderate pain, mild local swelling, hyperpigmentation.	[86]
		Imiquimod	No recurrence in 1 year	Pain, burning sensation, erythema, intermittent episodes of scaling and dryness.	
Patients: 4 BD	ALA	Radiotherapy	100% complete response. no recurrence in 1 year	Improve radiotherapy side effects.	[89]
Patients: 22 BD	ALA	CO ₂ Laser	Combined therapy: 72.73% (8/11) complete remission, 1 recurrence (9%) after 1 month. CO ₂ Laser: 63.63% (7/11) complete remission, 5 recurrence (45.45%) after 6 months	Local side effects included mild to moderate edema, erosion, ulceration, delayed healing, prolonged pain, and scarring.	[90]
			No recurrence in 6 months. 2 cases experienced recurrence in 1 year	Moderate pain, mild local swelling, hyperpigmentation.	
Patients: 5 SCC	ALA	Surgery			[86]

Table 3. Clinical studies of combined treatments with photodynamic therapy for basal cell carcinoma.

Number of Tumors	Photosensitizer (PDT)	Co-Adjuvant	Results	Reference
10 BCCs and 8 SCCs	ALA	Surgery	4 BCC complete response. 14 lesions reduction in lesion area. 2 lesions increased. No recurrence after TFD + Surgery.	[103]
		Surgery	30%–50% reduction in volume after PDT. No recurrence in two years and a half.	
6 Morphoeform BCCs	MAL	Surgery		[104]
32 BCCs	ALA	Surgery	No recurrence in one year.	[86]
1 nodular BCC	MAL	Imiquimod	50% reduction in volume after PDT. No recurrence 15 months.	[105]
3 giant BCCs	MAL	Imiquimod	20%–40% reduction in volume after the combined treatment. All needed surgery.	[43]
34 BCCs	ALA	Imiquimod	60% healing after PDT, and 75% after the combined one.	[106]

Table 3. Cont.

Number of Tumors	Photosensitizer (PDT)	Co-Adjuvant	Results	Reference
1 BCC	MAL	Imiquimod	No recurrence in two years	[107]
3 recurrent nodular BCCs on each patient (194 patients)	ALA	Er:YAG laser	Effectivity: 94.85% PDT, 91.75% laser, 98.9% after combined treatment.	[108]
75 BCCs	MAL	Er:YAG laser or diode laser	Effectivity: 81.2% PDT, 94.7% Er:YAG laser and 100% PDT diode laser.	[109]
13 nodular BCCs	MAL	CO ₂ laser	No recurrence. Mild hypopigmentation in 2 cases and mild discomfort with PDT.	[110]
56 nodular BCCs	MAL	Diode laser	Efficiency: 80.4% control group, 92.9% after combined treatment.	[111]
177 BCCs	MAL	CO ₂ laser	Efficiency: 97.1% with combined treatment. Mild hypopigmentation was occasionally seen and some discomfort with PDT.	[112]

BCC: basal cell carcinoma; ALA: aminolevulinic acid; MAL: methyl aminolevulinic acid; PDT: photodynamic therapy.

There are several papers about the combination of imiquimod and PDT for BCC. In one of them, 10 days after two sessions of PDT imiquimod was applied, five times a week for three weeks. Clinical clearing was obtained without recurrence over 15 months [105]. In another study, after three sessions of MAL-PDT, imiquimod was applied five times a week for six weeks. Three months later skin biopsies showed 22%–40% of lesion size reduction [44]. Osiecka *et al.* [106] treated 10 patients with ALA-PDT, and 24 patients with ALA-PDT plus imiquimod. Six patients (60%) were totally cured in the first group and four lesions (40%) decreased in size, whereas in the second group 18 lesions (75%) totally disappeared and six diminished. Requena *et al.* [107] reported a case of a giant recurrent basal cell carcinoma on the face successfully treated by a combination of MAL-PDT and imiquimod.

Regarding the combination with lasers, Smucler and Vlk studied the effectiveness of three different methods for the treatment of recurring nodular BCCs: ALA-PDT, Er:YAG laser, and the combination of both; this was the most effective, with an efficacy rate of 98.97% vs. 94.85% (PDT) and 91.75% (Er:YAG laser), and the best aesthetic results [108]. Later, the same group divided 67 patients into three groups based on tumor depth: <2 mm (PDT), 2–3 mm (Er:YAG laser ablation and PDT), and >3 mm (diode laser ablation and PDT). The treatment consisted of application of laser followed by MAL-PDT, repeated one and three weeks later. After six months, 100% clearance rate was observed in the group with the deepest tumors, 94.7% in that with tumors 2–3 mm in depth, and 81.2% in the group with the most superficial ones [109]. In other study, twelve patients were treated using combined CO₂ laser and PDT, and after 18.1 months of follow-up no recurrences were present [110]. To evaluate the pretreatment with a fractional laser before ALA-PDT, Lippert *et al.* [111] ablated 56 nodular BCCs using a diode laser. Half of them were treated after three weeks using a fractional carbon dioxide laser, and the other 28 with curettage followed by MAL-PDT. Fifty-two BCCs of the laser group responded to MAL-PDT, compared with only 45 of 56 in the control group. Shokrollahi *et al.* [112] treated 110 patients with a total number of 177 lesions with combined therapy using a CO₂ laser followed by two sessions of MAL-PDT one week apart. After a follow-up of 32.2 months the total recurrence-free rate was 97.1%. In 88.1% lesions, a single cycle of treatment was required, whereas 9.03% required two and three cycles in 0.56%. Recurrences were noted only in five cases (2.82%) and all of them were successfully retreated.

4. Conclusions

In general, the combination with other treatments improves the results of PDT. The possibility of adding two different mechanisms of action seems to be a good strategy to improve results and overcome PDT limitations (Figure 3). However, most of the performed studies include a small number of patients, the results are only clinically evaluated without histological confirmation, and finally the time of follow-up is not very long. A better knowledge of the molecular mechanisms implicated in PDT for the different NMSC will lead us not only to understand better which are the most promising combinations but also to explore new strategies to optimize them.



Figure 3. (a) Patient with recurrent Bowen disease after surgery and a cycle of methyl-aminolevulinate photodynamic therapy (MAL-PDT) (two sessions one week apart using $37 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ Aktilite® (Galderma SA, Paris, France); (b) Tumor persists one month after a second cycle of MAL-PDT and before treatment with topical imiquimod, five days per week during six weeks. (c) No recurrence after nine months of follow-up.

Acknowledgments

The work has been supported by Spanish MINECO grant FIS PI12/01253 and Comunidad Autónoma de Madrid grant SkinModel CAM S10/BMD-2359. Silvia Lucena and Nerea Salazar were supported by UAM-FPI fellowships.

Author Contributions

Yolanda Gilaberte, Ángeles Juarranz and Salvador Gonzalez conceived, wrote and revised the paper. Silvia Rocío Lucena, Nerea Salazar, Tamara Gracia-Cazaña and Alicia Zamarrón wrote and supplied materials and figures of the document. All authors approval the manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Zhao, B.; He, Y.Y. Recent advances in the prevention and treatment of skin cancer using photodynamic therapy. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2010**, *10*, 1797–1809.
2. Katalinic, A.; Kunze, U.; Schafer, T. Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer in Schleswig-Holstein, Germany: Incidence, clinical subtypes, tumour stages and localization (epidemiology of skin cancer). *Br. J. Dermatol.* **2003**, *149*, 1200–1206.
3. Eisemann, N.; Waldmann, A.; Geller, A.C.; Weinstock, M.A.; Volkmer, B.; Greinert, R.; Breitbart, E.W.; Katalinic, A. Non-melanoma skin cancer incidence and impact of skin cancer screening on incidence. *J. Investig. Dermatol.* **2014**, *134*, 43–50.
4. Sidoroff, M.D.; Thaler, P. Taking treatment decisions in non-melanoma skin cancer—The place for topical photodynamic therapy (PDT). *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2010**, *7*, 24–32.

5. Kim, Y.; He, Y.Y. Ultraviolet radiation-induced non-melanoma skin cancer: Regulation of DNA damage repair and inflammation. *Genes Dis.* **2014**, *1*, 188–198.
6. Ericson, M.B.; Wennberg, A.M.; Larkö, O. Review of photodynamic therapy in actinic keratosis and basal cell carcinoma. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2008**, *4*, 1–9.
7. Koyuncuer, A. Histopathological evaluation of non-melanoma skin cancer. *World J. Surg. Oncol.* **2014**, *12*, 159–165.
8. Berking, C.; Hauschild, A.; Kölbl, O.; Mast, G.; Gutzmer, R. Basal cell carcinoma-treatments for the commonest skin cancer. *Dtsch. Arztebl. Int.* **2014**, *111*, 389–395.
9. Blanplain, C.; Fuchs, E. Stem cell plasticity. Plasticity of epithelial stem cell in tissue regeneration. *Science* **2014**, *344*, 1243–1253.
10. Dlugosz, A.; Merlino, G.; Yuspa, S.H. Progress in cutaneous cancer research. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **2002**, *7*, 17–26.
11. Goldman, G.D. Squamous cell cancer: A practical approach. *Semin. Cutan. Med. Surg.* **1998**, *17*, 80–95.
12. Kolk, A.; Wolff, K.D.; Smeets, R.; Kesting, M.; Hein, R.; Eckert, A.W. Melanotic and non-melanotic malignancies of the face and external ear—A review of current treatment concepts and future options. *Cancer Treat. Rev.* **2014**, *40*, 819–837.
13. Martorell-Calatayud, A.; Sanmartín, O.; Cruz J.; Guillén, C. Cutaneous squamous cell carcinoma: Defining the high-risk variant. *Actas Dermosifiliogr.* **2013**, *104*, 367–379.
14. Hofbauer, G.F.; Bouwes, J.N.; Euvrard, S. Organ transplantation and skin cancer: Basic problems and new perspectives. *Exp. Dermatol.* **2010**, *19*, 473–482.
15. Cockerell, C.J. Histopathology of incipient intraepidermal squamous cell carcinoma (“actinic keratosis”). *J. Am. Acad. Dermatol.* **2000**, *42*, 11–17.
16. Fernández-Figueras, M.T.; Carrato, C.; Sáenz, X.; Puig, L.; Musulen, E.; Ferrándiz, C.; Ariza, A. Actinic keratosis with atypical basal cells (AK I) is the most common lesion associated with invasive squamous cell carcinoma of the skin. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2015**, *29*, 991–997.
17. Patel, R.V.; Frankel, A.; Goldenberg, G. An update on nonmelanoma skin cancer. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* **2011**, *4*, 20–27.
18. Kauvar, A.N.; Cronin, T., Jr.; Roenigk, R.; Hruza, G.; Bennett, R. Consensus for nonmelanoma skin cancer treatment: Basal cell carcinoma, including a cost analysis of treatment methods. *Dermatol. Surg.* **2015**, *41*, 550–571.
19. Ferrándiz, C.; Fonseca-Capdevila, E.; García-Diez, A.; Guillén-Barona, C.; Belinchón-Romero, I.; Redondo-Bellón, P.; Moreno-Giménez, J.C.; Senán, R. Spanish adaptation of the European guidelines for the evaluation and treatment of actinic keratosis. *Actas Dermosifiliogr.* **2014**, *105*, 378–393.
20. Morton, C.A. Photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer—And more? *Arch. Dermatol.* **2004**, *140*, 116–120.
21. Marmur, E.S.; Schmults, C.D.; Goldberg, D.J. A review of laser and photodynamic therapy for the treatment of nonmelanoma skin cancer. *Dermatol. Surg.* **2004**, *30*, 264–271.
22. Kormeli, T.; Yamauchi, P.S.; Lowe, N.J. Topical photodynamic therapy in clinical dermatology. *Br. J. Dermatol.* **2004**, *150*, 1061–1069.

23. Lehmann, P. Methyl aminolaevulinate-photodynamic therapy: A review of clinical trials in the treatment of actinic keratoses and nonmelanoma skin cancer. *Br. J. Dermatol.* **2007**, *156*, 793–801.
24. Braathen, L.R.; Szeimies, R.M.; Basset-Seguin, N.; Bissonnette, R.; Foley, P.; Pariser, D.; Roelandts, R.; Wennberg, A.M.; Morton, C.A. Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: An international consensus. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2007**, *56*, 125–143.
25. Steinbauer, J.M.; Schreml, S.; Kohl, E.A.; Karrer, S.; Landthaler, M.; Szeimies, R.M. Photodynamic therapy in dermatology. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* **2010**, *8*, 454–464.
26. Morton, C.; Szeimies, R.M.; Sidoroff, A.; Wennberg, A.M.; Basset-Seguin, N.; Calzavara-Pinton, P.; Gilaberte, Y.; Hofbauer, G.; Hunger, R.; Karrer, S.; *et al.* European Dermatology Forum Guidelines on topical photodynamic therapy. *Eur. J. Dermatol.* **2015**, *25*, 296–311.
27. Choudhary, S.; Nouri, K.; Elsaie, M.L. Photodynamic therapy in dermatology: A review. *Lasers Med. Sci.* **2009**, *24*, 971–980.
28. Christensen, E.; Warloe, T.; Kroon, S.; Funk, J.; Helsing, P.; Soler, A.M.; Stang, H.J.; Vatne, O.; Mørk, C. Guidelines for practical use of MAL-PDT in non-melanoma skin cancer. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2010**, *24*, 505–512.
29. Henderson, B.W.; Dougherty, T.J. How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.* **1992**, *55*, 145–157.
30. Mfouo-Tynga, I.; Abrahamse, H. Cell death pathways and phthalocyanine as an efficient agent for photodynamic cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 10228–10241.
31. Blume, J.E.; Oseroff, A.R. Aminolevulinic acid photodynamic therapy for skin cancers. *Dermatol. Clin.* **2007**, *25*, 5–14.
32. Evangelou, G.; Farrar, M.D.; Cotterell, L.; Andrew, S.; Tosca, A.D.; Watson, R.E.; Rhodes, L.E. Topical photodynamic therapy significantly reduces epidermal Langerhans cells during clinical treatment of basal cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.* **2012**, *166*, 1112–1115.
33. Morton, C.A.; Szeimies, R.M.; Sidoroff, A.; Braathen, L.R. European guidelines for topical photodynamic therapy part 1: Treatment delivery and current indications-actinic keratoses, Bowen's disease, basal cell carcinoma. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2013**, *27*, 536–544.
34. Kasche, A.; Luderschmidt, S.; Ring, J.; Hein, R. Photodynamic therapy induces less pain in patients treated with methyl aminolevulinate compared to aminolevulinic acid. *J. Drugs Dermatol.* **2006**, *5*, 353–356.
35. Halldin, C.B.; Gillstedt, M.; Paoli, J.; Wennberg, A.M.; Gonzalez, H. Predictors of pain associated with photodynamic therapy: A retrospective study of 658 treatments. *Acta Derm. Venereol.* **2011**, *91*, 545–551.
36. Attili, S.K.; Dawe, R.; Ibbotson, S. A review of pain experienced during topical photodynamic therapy-our experience in Dundee. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2011**, *8*, 53–57.
37. Gholam, P.; Denk, K.; Sehr, T.; Enk, A.; Hartmann, M. Factors influencing pain intensity during topical photodynamic therapy of complete cosmetic units for actinic keratoses. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2010**, *63*, 213–218.
38. Borroni, R.G.; Carugno, A.; Rivetti, N.; Arbustini, E.; Brazzelli, V. Risk of acute postoperative hypertension after topical photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2013**, *29*, 73–77.

39. McKay, K.M.; Sambrano, B.L.; Fox, P.S.; Bassett, R.L.; Chon, S.; Prieto, V.G. Thickness of superficial basal cell carcinoma (sBCC) predicts imiquimod efficacy: A proposal for a thickness-based definition of sBCC. *Br. J. Dermatol.* **2013**, *169*, 549–554.
40. Roozeboom, M.H.; van Kleef, L.; Arits, A.H.; Mosterd, K.; Winnepenninckx, V.J.; van Marion, A.M.; Nelemans, P.J.; Kelleners-Smeets, N.W. Tumor thickness and adnexal extension of superficial basal cell carcinoma (sBCC) as determinants of treatment failure for methyl aminolevulinate (MAL)-photodynamic therapy (PDT), imiquimod, and 5-fluorouracil (FU). *J. Am. Acad. Dermatol.* **2015**, *73*, 93–98.
41. Christensen, E.; Mørk, C.; Foss, O.A. Pre-treatment deep curettage can significantly reduce tumour thickness in thick Basal cell carcinoma while maintaining a favourable cosmetic outcome when used in combination with topical photodynamic therapy. *J. Skin Cancer* **2011**, *2011*, 1–6.
42. Ramirez, D.P.; Kurachi, C.; Inada, N.M.; Moriyama L.T.; Salvio, A.G.; Vollet Filho, J.D.; Pires, L.; Buzzá, H.H.; de Andrade, C.T.; Greco, C.; *et al.* Experience and BCC subtypes as determinants of MAL-PDT response: Preliminary results of a national Brazilian project. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2014**, *11*, 22–26.
43. Madan, V.; West, C.A.; Murphy, J.V.; Lear, J.T. Sequential treatment of giant basal cell carcinomas. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* **2009**, *62*, 368–372.
44. Fritsch, C.; Goerz, G.; Ruzicka, T. Photodynamic therapy in dermatology. *Arch. Dermatol.* **1998**, *134*, 207–214.
45. Horn, M.; Wolf, P.; Wulf, H.C.; Warloe, T.; Fritsch, C.; Rhodes, L.E.; Kaufmann, R.; de Rie, M.; Legat, F.J.; Stender, I.M.; *et al.* Topical methyl aminolaevulinate photodynamic therapy in patients with basal cell carcinoma prone to complications and poor cosmetic out-come with conventional treatment. *Br. J. Dermatol.* **2003**, *149*, 1242–1249.
46. Rhodes, L.E.; de Rie, M.A.; Leifsdottir, R.; Yu, R.C.; Bachmann, I.; Goulden, V.; Wong, G.A.; Richard, M.A.; Anstey, A.; Wolf, P. Five-year follow-up of a randomized, prospective trial of topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy vs surgery for nodular basal cell carcinoma. *Arch. Dermatol.* **2007**, *143*, 1131–1136.
47. Szeimies, R.M.; Ibbotson, S.; Murrell, D.F.; Rubel, D.; Frambach, Y.; de Berker, D.; Dummer, R.; Kerrouche, N.; Villemagne, H. A clinical study comparing methyl aminolevulinate photodynamic therapy and surgery in small superficial basal cell carcinoma (8–20 mm), with a 12-month follow-up. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2008**, *22*, 1302–1311.
48. Vinciullo, C.; Elliott, T.; Francis, D.; Gebauer, K.; Spelman, L.; Nguyen, R.; Weightman, W.; Sheridan, A.; Reid, C.; Czarnecki, D.; *et al.* Photodynamic therapy with topical methyl aminolaevulinate for “difficult-to-treat” basal cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.* **2005**, *152*, 765–772.
49. Morton, C.A.; Whitehurst, C.; McColl, J.H.; Moore, J.V.; MacKie, R.M. Photodynamic therapy for large or multiple patches of bowen disease and basal cell carcinoma. *Arch. Dermatol.* **2001**, *137*, 319–324.
50. Fantini, F.; Greco, A.; del Giovane, C.; Cesinaro, A.M.; Venturini, M.; Zane, C.; Surrenti, T.; Peris, K.; Calzavara-Pinton, P.G. Photodynamic therapy for basal cell carcinoma: Clinical and pathological determinants of response. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2011**, *25*, 896–901.
51. Lopez, N.; Meyer-Gonzalez, T.; Herrera-Acosta, E.; Bosch, R.; Castillo, R.; Herrera, E. Photodynamic therapy in the treatment of extensive Bowen’s disease. *J. Dermatol. Treat.* **2012**, *23*, 428–430.

52. Stables, G.I.; Stringer, M.R.; Robinson, D.J.; Ash, D.V. Large patches of Bowen's disease treated by topical aminolaevulinic acid photodynamic therapy. *Br. J. Dermatol.* **1997**, *136*, 957–960.
53. Calzavara-Pinton, P.G.; Venturini, M.; Sala, R.; Capezzer, R.; Parrinello, G.; Specchia, C.; Zane, C. Methyl aminolevulinate-based photodynamic therapy of Bowen's disease and squamous cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.* **2008**, *159*, 137–144.
54. Park, J.Y.; Kim, S.K.; Cho, K.H.; Kim, Y.C. Huge Bowen's disease: A pitfall of topical photodynamic therapy. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2013**, *10*, 546–548.
55. Morton, C.A.; Campbell, S.; Gupta, G.; Keohane, S.; Lear, J.; Zaki, I.; Walton, S.; Kerrouche, N.; Thomas, G.; Soto, P. Intraindividual, right-left comparison of topical methyl aminolaevulinate-photodynamic therapy and cryotherapy in subjects with actinic keratoses: A multicentre, randomized controlled study. *Br. J. Dermatol.* **2006**, *155*, 1029–1036.
56. Kaufmann, R.; Spelman, L.; Weightman, W.; Reifemberger, J.; Szeimies, R.M.; Verhaeghe, E.; Kerrouche, N.; Sorba, V.; Villemagne, H.; Rhodes, L.E. Multicentre intraindividual randomized trial of topical methyl aminolaevulinate-photodynamic therapy vs. cryotherapy for multiple actinic keratoses on the extremities. *Br. J. Dermatol.* **2008**, *158*, 994–999.
57. Morton, C.A.; Birnie, A.J.; Eedy, D.J. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of squamous cell carcinoma *in situ* (Bowen's disease) 2014. *Br. J. Dermatol.* **2014**, *170*, 245–260.
58. Nissen, C.V.; Philipsen, P.A.; Wulf, H.C. PpIX formation after topical application of methyl aminolevulinate and BF-200 ALA declines with age. *Br. J. Dermatol.* **2015**, *173*, 760–766.
59. Tehranchinia, Z.; Rahimi, H.; Ahadi, M.S.; Ahadi, M.S. Aminolevulinic Acid-photodynamic therapy of Basal cell carcinoma and factors affecting the response to treatment: A clinical trial. *Indian J. Dermatol.* **2013**, *58*, doi:10.4103/0019-5154.113968.
60. Holohan, C.; van Schaeybroeck, S.; Longley, D.B.; Johnston, P.G. Cancer drug resistance: An evolving paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 714–726.
61. Longley, D.B.; Johnston, P.G. Molecular mechanisms of drug resistance. *J. Pathol.* **2005**, *205*, 275–292.
62. Gillet, J.P.; Gottesman, M. Mechanisms of multidrug resistance in cancer. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *596*, 47–76.
63. Hombach-Klonisch, S.; Natarajan, S.; Thanasupawat, T.; Medapati, M.; Pathak, A.; Ghavami, S.; Klonisch, T. Mechanisms of therapeutic resistance in cancer (stem) cells with emphasis on thyroid cancer cells. *Front. Endocrinol.* **2014**, *5*, 1–10.
64. Al-Dimassi, S.; Abou-Antoun, T.; El-Sibai, M. Cancer cell resistance mechanisms: A mini review. *Clin. Transl. Oncol.* **2014**, *16*, 511–516.
65. Maydan, E.; Noofoth, P.K.; Goldman, M.P. Case reports: Development of a keratoacanthoma after topical photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid. *J. Drugs Dermatol.* **2006**, *5*, 804–806.
66. Fiechter, S.; Skaria, A.; Nievergelt, H.; Anex, R.; Borradori, L.; Parmentier, L. Facial basal cell carcinomas recurring after photodynamic therapy: A retrospective analysis of histological subtypes. *Dermatology* **2012**, *224*, 346–351.
67. Bardazzi, F.; Loi, C.; Magnano, M.; Burtica, E.C.; Giordano, F.; Patrizi, A. Methyl-aminolevulinic acid photodynamic therapy for actinic keratoses: An useful treatment or a risk factor? A retrospective study. *J. Dermatol. Treat.* **2015**, *26*, 168–170.

68. Kessel, D. More Adventures in Photodynamic Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 15188–15193.
69. Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K.A.; Foster, T.H.; Girotti, A.W.; Gollnick, S.O.; Hahn, S.M.; Hamblin, M.R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; *et al.* Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 250–281.
70. Casas, A.; di Venosa, G.; Hasan, T.; Batlle, A. Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 2486–2515.
71. Muthusamy, V.; Piva, T.J. The UV response of the skin: A review of the MAPK, NF- κ B and TNF- α signal transduction pathways. *Arch. Dermatol. Res.* **2010**, *302*, 5–17.
72. Kuźbicki, L.; Lange, D.; Stanek-Widera, A.; Chwirut, B.W. Different expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in selected nonmelanocytic human cutaneous lesions. *Folia Histochem. Cytobiol.* **2011**, *49*, 381–388.
73. Müller-Decker, K. Cyclooxygenase-dependent signaling is causally linked to non-melanoma skin carcinogenesis: Pharmacological, genetic, and clinical evidence. *Cancer Metastasis Rev.* **2011**, *30*, 343–361.
74. Walls, B.; Jordan, L.; Diaz, L.; Miller, R. Targeted therapy for cutaneous oncology: A review of novel treatment options for non-melanoma skin cancer: Part I. *J. Drugs Dermatol.* **2014**, *13*, 947–952.
75. Bahner, J.D.; Bordeaux, J.S. Non-melanoma skin cancers: Photodynamic therapy, cryotherapy, 5-fluorouracil, imiquimod, diclofenac, or what? Facts and controversies. *Clin. Dermatol.* **2013**, *31*, 792–798.
76. Gilbert, D.J. Treatment of actinic keratoses with sequential combination of 5-fluorouracil and photodynamic therapy. *J. Drugs Dermatol.* **2005**, *4*, 161–163.
77. Martin, G. Prospective, case-based assessment of sequential therapy with topical Fluorouracil cream 0.5% and ALA-PDT for the treatment of actinic keratosis. *J. Drugs Dermatol.* **2011**, *10*, 372–378.
78. Shaffelburg, M. Treatment of actinic keratoses with sequential use of photodynamic therapy; and imiquimod 5% cream. *J. Drugs Dermatol.* **2009**, *8*, 35–39.
79. Serra-Guillén, C.; Nagore, E.; Hueso, L.; Traves, V.; Messeguer, F.; Sanmartín, O.; Llombart, B.; Requena, C.; Botella-Estrada, R.; Guillén, C. A randomized pilot comparative study of topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy vs. imiquimod 5% vs. sequential application of both therapies in immunocompetent patients with actinic keratosis: Clinical and histologic outcomes. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2012**, *66*, 131–137.
80. Held, L.; Eigentler, T.K.; Leiter, U.; Garbe, C.; Berneburg, M.J. Effective combination of photodynamic therapy and imiquimod 5% cream in the treatment of actinic keratoses: Three cases. *Biomed. Res. Int.* **2013**, *2013*, 1–5.
81. Akita, Y.; Kozaki, K.; Nakagawa, A.; Saito, T.; Ito, S.; Tamada, Y.; Fujiwara, S.; Nishikawa, N.; Uchida, K.; Yoshikawa, K.; *et al.* Cyclooxygenase-2 is a possible target of treatment approach in conjunction with photodynamic therapy for various disorders in skin and oral cavity. *Br. J. Dermatol.* **2004**, *151*, 472–480.
82. Bagazgoitia, L.; Cuevas, J.; Juarranz, A.; Jaén, P. Photodynamic therapy reduces the histological features of actinic damage and the expression of early oncogenic markers. *Br. J. Dermatol.* **2011**, *165*, 144–151.

83. Van der Geer, S.; Krekels, G.A. Treatment of actinic keratoses on the dorsum of the hands: ALA-PDT vs. diclofenac 3% gel followed by ALA-PDT. A placebo-controlled, double-blind, pilot study. *J. Dermatol. Treat.* **2009**, *20*, 259–265.
84. Berman, B.; Nestor, M.S.; Newburger, J.; Park, H.; Swenson, N. Treatment of facial actinic keratoses with aminolevulinic acid photodynamic therapy (ALA-PDT) or ingenol mebutate 0.015% gel with and without prior treatment with ALA-PDT. *J. Drugs Dermatol.* **2014**, *13*, 1353–1356.
85. Togsverd-Bo, K.; Lei, U.; Erlendsson, A.M.; Taudorf, E.H.; Philipsen, P.A.; Wulf, H.C.; Skov, L.; Hædersdal, M. Combination of ablative fractional laser and daylight-mediated photodynamic therapy for actinic keratosis in organ transplant recipients—A randomized controlled trial. *Br. J. Dermatol.* **2015**, *172*, 467–474.
86. Lu, Y.G.; Wang, Y.Y.; Yang, Y.D.; Zhang, X.C.; Gao, Y.; Yang, Y.; Zhang, J.B.; Li, G.L. Efficacy of topical ALA-PDT combined with excision in the treatment of skin malignant tumor. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2014**, *11*, 122–126.
87. Sotiriou, E.; Lallas, A.; Apalla, Z.; Ioannides, D. Treatment of giant Bowen’s disease with sequential use of photodynamic therapy and imiquimod cream. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2011**, *27*, 164–166.
88. Rong, Y.; Zuo, L.; Shang, L.; Bazan, J.G. Radiotherapy treatment for nonmelanoma skin cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2015**, *15*, 765–776.
89. Nakano, A.; Watanabe, D.; Akita, Y.; Kawamura, T.; Tamada, Y.; Matsumoto, Y. Treatment efficiency of combining photodynamic therapy and ionizing radiation for Bowen’s disease. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2011**, *25*, 475–478.
90. Cai, H.; Wang, Y.X.; Zheng, J.C.; Sun, P.; Yang, Z.Y.; Li, Y.L.; Liu, X.Y.; Li, Q.; Liu, W. Photodynamic therapy in combination with CO₂ laser for the treatment of Bowen’s disease. *Lasers Med. Sci.* **2015**, *30*, 1505–1510.
91. Ishida, N.; Watanabe, D.; Akita, Y.; Nakano, A.; Yamashita, N.; Kuhara, T.; Yanagishita, T.; Takeo, T.; Tamada, Y.; Matsumoto, Y. Etretnate enhances the susceptibility of human skin squamous cell carcinoma cells to 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy. *Clin. Exp. Dermatol.* **2009**, *34*, 385–389.
92. Anand, S.; Honari, G.; Hasan, T.; Elson, P.; Maytin, E.V. Low-dose methotrexate enhances aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in skin carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 3333–3343.
93. Caini, S.; Boniol, M.; Tosti, G.; Magi, S.; Medri, M.; Stanganelli, I.; Palli, D.; Assedi, M.; Marmol, V.D.; Gandini, S. Vitamin D and melanoma and non-melanoma skin cancer risk and prognosis: A comprehensive review and meta-analysis. *Eur. J. Cancer* **2014**, *50*, 2649–2658.
94. Pereira, F.; Larriba, M.J.; Muñoz, A. Vitamin D and colon cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **2012**, *19*, 51–71.
95. Uhmman, A.; Niemann, H.; Lammering, B.; Henkel, C.; Hess, I.; Nitzki, F.; Fritsch, A.; Prüfer, N.; Rosenberger, A.; Dullin, C.; *et al.* Antitumoral effects of calcitriol in basal cell carcinomas involve inhibition of hedgehog signaling and induction of vitamin D receptor signaling and differentiation. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 2179–2188.

96. Cicarma, E.; Tuorkey, M.; Juzeniene, A.; Ma, L.W.; Moan, J. Calcitriol treatment improves methyl aminolaevulinate-based photodynamic therapy in human squamous cell carcinoma A431 cells. *Br. J. Dermatol.* **2009**, *161*, 413–418.
97. Anand, S.; Wilson, C.; Hasan, T.; Maytin, E.V. Vitamin D3 enhances the apoptotic response of epithelial tumors to aminolevulinate-based photodynamic therapy. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 6040–6050.
98. Anand, S.; Rollakanti, K.R.; Horst, R.L.; Hasan, T.; Maytin, E.V. Combination of oral vitamin D3 with photodynamic therapy enhances tumor cell death in a murine model of cutaneous squamous cell carcinoma. *Photochem. Photobiol.* **2014**, *90*, 1126–1135.
99. Rollakanti, K.; Anand, S.; Maytin, E.V. Topical calcitriol prior to photodynamic therapy enhances treatment efficacy in non-melanoma skin cancer mouse models. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.* **2015**, *2*, 1–13.
100. Gilaberte, Y.; Milla, L.; Salazar, N.; Vera-Alvarez, J.; Kourani, O.; Damian, A.; Rivarola, V.; Roca, M.J.; Espada, J.; González, S.; *et al.* Cellular intrinsic factors involved in the resistance of squamous cell carcinoma to photodynamic therapy. *J. Investig. Dermatol.* **2014**, *134*, 2428–2437.
101. Martinez-Carpio, P.A.; Trelles, M.A. The role of epidermal growth receptor in photodynamic therapy: A review of the literature and proposal for future investigations. *Lasers Med. Sci.* **2010**, *25*, 767–771.
102. Weyergang, A.; Selbo, P.K.; Berg, K. Sustained ERK inhibition by EGFR targeting therapies is a predictive factor for synergistic cytotoxicity with PDT as neoadjuvant therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 2659–2670.
103. Jeremic, G.; Brandt, M.G.; Jordan, K.; Doyle, P.C.; Yu, E.; Moore, C.C. Using photodynamic therapy as a neoadjuvant treatment in the surgical excision of nonmelanotic skin cancers: Prospective study. *J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **2011**, *40*, 82–89.
104. Torres, T.; Fernandes, I.; Costa, V.; Selores, M. Photodynamic therapy as adjunctive therapy for morpheaform basal cell carcinoma. *Acta Dermatovenereol. Alp. Pannonica Adriat.* **2011**, *20*, 23–25.
105. Devirgiliis, V.; Panasiti, V.; Curzio, M.; Gobbi, S.; Rossi, M.; Roberti, V.; Calvieri, S. Complete remission of nodular basal cell carcinoma after combined treatment with photodynamic therapy and imiquimod 5% cream. *Dermatol. Online J.* **2008**, *14*, 25, PMID: 18700128
106. Osiecka, B.; Jurczynszyn, K.; Ziółkowski, P. The application of Levulan-based photodynamic therapy with imiquimod in the treatment of recurrent basal cell carcinoma. *Med. Sci. Monit.* **2012**, *18*, 5–9.
107. Requena, C.; Messegue, F.; Llombart, B.; Serra-Guillén, C.; Guillén, C. Facial extensive recurrent basal cell carcinoma: Successful treatment with photodynamic therapy and imiquimod 5% cream. *Int. J. Dermatol.* **2012**, *51*, 451–454.
108. Smucler, R.; Vlk, M. Combination of Er:YAG laser and photodynamic therapy in the treatment of nodular basal cell carcinoma. *Lasers Surg. Med.* **2008**, *40*, 153–158.
109. Smucler, R.; Kriz, M.; Lippert, J.; Vlk, M. Ultrasound guided ablative-laser assisted photodynamic therapy of basal cell carcinoma (US-aL-PDT). *Photomed. Laser Surg.* **2012**, *30*, 200–205.

110. Whitaker, I.S.; Shokrollahi, K.; James, W.; Mishra, A.; Lohana, P.; Murison, M.C. Combined CO₂ laser with photodynamic therapy for the treatment of nodular basal cell carcinomas. *Ann. Plast. Surg.* **2007**, *59*, 484–488.
111. Lippert, J.; Smucler, R.; Vlk, M. Fractional carbon dioxide laser improves nodular basal cell carcinoma treatment with photodynamic therapy with methyl 5-aminolevulinate. *Dermatol. Surg.* **2013**, *39*, 1202–1208.
112. Shokrollahi, K.; Javed, M.; Aeuyung, K.; Ghattaura, A.; Whitaker, I.S.; O’Leary, B.; James, W.; Murison, M. Combined carbon dioxide laser with photodynamic therapy for nodular and superficial basal cell carcinoma. *Ann. Plast. Surg.* **2014**, *73*, 552–558.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



ACTAS Derma-Sifiliográficas

Full English text available at
www.actasdermo.org



REVIEW

Resistance of Nonmelanoma Skin Cancer to Nonsurgical Treatments. Part I: Topical Treatments[☆]

T. Gracia-Cazaña,^{a,b,*} S. González,^{c,d} Y. Gilaberte^{b,e}

^a Unidad de Dermatología, Hospital de Barbastro, Barbastro, Huesca, Spain

^b Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza, Spain

^c Servicio de Dermatología, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Nueva York, EE. UU.

^d Departamento de Medicina, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

^e Unidad de Dermatología, Hospital San Jorge, Huesca, Spain

Received 11 January 2016; accepted 30 April 2016

KEYWORDS

Skin cancer;
Imiquimod;
5-Fluorouracil;
Diclofenac;
Ingenol

PALABRAS CLAVE

Cáncer cutáneo;
Imiquimod;
5-Fluorouracilo;
Diclofenaco;
Ingenol

Abstract A wide range of treatments is now available for nonmelanoma skin cancer (NMSC), including 5-fluorouracil, ingenol mebutate, imiquimod, diclofenac, photodynamic therapy, methotrexate, cetuximab, vismodegib, and radiotherapy. All are associated with high clinical and histologic response rates. However, some tumors do not respond due to resistance, which may be primary or acquired. Study of the resistance processes is a broad area of research that aims to increase our understanding of the nature of each tumor and the biologic features that make it resistant, as well as to facilitate the design of new therapies directed against these tumors. In this article we review resistance to the authorized topical treatments for NMSC.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. and AEDV. All rights reserved.

Resistencia al tratamiento no quirúrgico en cáncer cutáneo no melanoma. Parte I: tratamientos tópicos

Resumen En la actualidad existe una amplia variedad de tratamientos para el cáncer cutáneo no melanoma (CCNM), como son 5-fluorouracilo, mebutato de ingenol, imiquimod, diclofenaco, terapia fotodinámica (TFD), metotrexato, cetuximab, vismodegib, radioterapia, todos ellos con altas tasas de respuesta clínica e histológica. Sin embargo, algunos tumores no responden al

[☆] Please cite this article as: Gracia-Cazaña T, González S, Gilaberte Y. Resistencias al tratamiento no quirúrgico en cáncer cutáneo no melanoma. Parte I: tratamientos tópicos. Actas Dermosifiliogr. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ad.2016.04.019>

* Corresponding author.

E-mail addresses: tamgracaz@gmail.com, tamara.gracia@hotmail.com (T. Gracia-Cazaña).

tratamiento, debido a la aparición de resistencias, tanto primarias como adquiridas. El estudio de los procesos de resistencia es un campo extenso de investigación que conlleva ampliar los conocimientos de la naturaleza de cada tumor, las características biológicas que lo hacen resistente y el diseño de nuevas terapias dirigidas contra los mismos. En el presente artículo se revisan las resistencias a los tratamientos tópicos autorizados para el CCNM.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. y AEDV. Todos los derechos reservados.

Introduction

There are many options available for the treatment of different types of nonmelanoma skin cancer (NMSC), including actinic keratosis (AK). This is important as surgery has its limitations and is not always feasible, such as when patients have multiple and/or extensive lesions or lesions in cosmetically sensitive areas. The introduction of chemotherapy drugs in recent years has increased the treatment options available and produced high complete response rates. Non-surgical procedures have several advantages. In particular, they are noninvasive, offer excellent cosmetic results, and can be combined with other treatments and repeated. Examples of nonsurgical options used to treat NMSC are retinoids, 5 fluorouracil (5-FU), diclofenac, imiquimod, and photodynamic therapy (Table 1).¹⁻¹³

The effectiveness of the above treatments, however, is limited by treatment resistance. Tumor cell resistance is defined as an absence of sensitivity to anticancer drugs and it has multiple, complex causes. Resistance is the main reason why anticancer drugs fail and it has an important role in tumor progression and poor prognosis. Although resistance to chemotherapy and radiotherapy has been extensively studied, we are still far from understanding the mechanisms involved. Generally speaking, the first treatment a patient receives destroys the majority of tumor cells, but if the tumor does not respond adequately to this treatment, resistant cancer cells will remain and may even become more aggressive after several treatment cycles.¹⁴

Resistance can be generally classified as intrinsic or acquired. Intrinsic resistance is characterized by the presence of pre-existing factors that influence how the tumor cells will respond to treatment, while acquired resistance develops after the treatment of *a priori* sensitive tumors. Intrinsic resistance is a complex process related to diverse biochemical and molecular features of the tumor that allow certain cells to avoid death. Acquired resistance, by contrast, can be caused by different factors, including the limited amount of drug or radiation that reaches the tumor, factors in the tumor environment, and possible mutations that arise in tumor cells during treatment.¹⁵

Additional adaptive responses also need to be considered, such as increased expression of the therapeutic target and activation of alternative compensatory signaling pathways. Cross-resistance is another problem, as once treated, tumors can develop resistance to other drugs, as occurs in multidrug resistance. Finally, certain tumors are highly heterogeneous and contain cells with different phenotypic, genetic, and/or epigenetic characteristics, meaning that sensitivity to treatment will vary according to the area of the tumor.¹⁶⁻¹⁸

In this article we offer an overview of resistance to non-surgical treatments in NMSC based on a review of case reports and series and research into the possible mechanisms involved. Studies of resistance will contribute to a better understanding of tumor biology and will help to determine how best to combine treatments to improve response rates and reduce adverse effects.¹⁹

In the first of 2 articles, we will review work on possible mechanisms of resistance to the following topical treatments for NMSC: 5-FU, imiquimod, diclofenac, and ingenol mebutate.

Resistance to 5-FU

5-FU is a fluoropyrimidine that acts as an antimetabolite by binding to the enzyme thymidylate synthase, which is responsible for the synthesis of nucleotides. The resulting inhibition of thymidylate synthase leads to a reduction in DNA synthesis and cell proliferation, inducing cell death. These effects are particularly evident in cells with high mitotic rates, such as neoplastic cells. 5-FU is also incorporated into DNA or RNA, interfering with their normal functioning (Fig. 1).²⁰⁻²²

Topical 5-FU is approved for the treatment of AK at concentrations of 0.5%, 1%, 2%, and 5%. The 5% formulation, applied twice daily for at least 6 weeks, is indicated for superficial basal cell carcinoma (BCC) and is associated with an approximate cure rate of 93%. Topical 5-FU is not indicated for the treatment of Bowen disease.²²⁻²⁴

In the largest series to date supporting the efficacy of topical 5-FU in the treatment of superficial BCC, a histologic cure rate of 90% was reported after 3 weeks for 31 superficial lesions treated twice daily for 11 weeks. Although the follow-up time was short, a treatment resistance rate of 10% was observed.^{23,25} Topical 5-FU is much less effective in nodular BCCs, and its use in this setting has had limited success.²⁶

In the case of AK, 5% 5-FU cream applied for 2 to 4 weeks produced a clinical cure rate of 96% and a histological cure rate of 67%, although 54% of tumors had relapsed at 12 months.²⁷

Although 5-FU is not approved for the treatment of squamous cell carcinoma (SCC), its efficacy in this setting has been analyzed in several studies. In one of these, 29 patients with SCC *in situ* were treated with 5-FU cream (Efudix) for 4 weeks. The cream was applied once a day for the first week and twice a day for the remaining weeks. Three months after the last treatment, a complete response rate of 83% was observed but at the 12-month follow-up, this had fallen to 69% and was accompanied by a recurrence rate of 17%.²⁸ In another study of 26 patients with Bowen disease treated

Table 1 Indications for Different Treatments Available for Nonmelanoma Skin Cancer, Including Approved and Off-Label Uses.

	Iniquimod 5% ^{1,2}	5-Fluorouracil ^{1,3,4}	Topical 3% diclofenac gel and 2.5% hyaluronic acid ^{1,5}	Ingenol Mebutate ^{1,6,7}	Photodynamic Therapy ^{1,8}	Vismodegib ^{1,9}	Cetuximab ^{10,11}	Intralesional Chemotherapy ^{12,13}
Approved uses (SPC)	Clinically typical nonhyperkeratotic, nonhypertrophic AKs on the face or scalp in immunocompetent adult patients	Slightly palpable and/or moderately thick hyperkeratotic AK (grade I/II) in adults (at concentration of 5 mg of fluorouracil and 100 mg of salicylic acid) Multiple AKs (at concentration of 5%) sBCC	AK	Nonhyperkeratotic and nonhypertrophic AKs in adults	AK			
Other conditions	AKs in other locations and in immunodepressed patients Nodular BCC Bowen disease Keratoacanthoma Paget disease Erythroplasia of Queyrat SCC	Bowen disease	Bowen disease	BCC Bowen disease	sBCC Nodular BCC	Symptomatic metastatic BCC Locally advanced BCC inappropriate for surgery or radiotherapy	Locally advanced, unresectable, or metastatic SCC Unresectable BCC in monotherapy or associated with smoothened inhibitors to reduce resistance	Methotrexate: keratoacanthoma, SCC Bleomycin: AK, sBCC, and Bowen disease Interferon alfa-2, alfa-2a, and alfa-2b: BCC, SCC, and AK Interferon β and γ: BCC

Abbreviations: AK, actinic keratosis; BCC, basal cell carcinoma; sBCC, superficial basal cell carcinoma; SCC, squamous cell carcinoma.

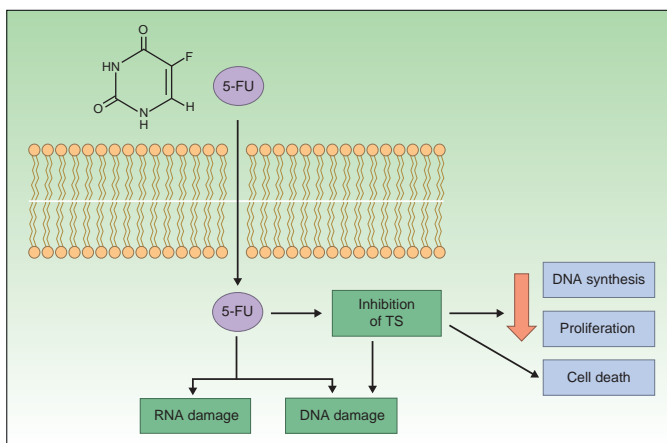


Figure 1 Mechanism of action of 5-fluorouracil (5-FU), which binds to and inhibits the enzyme thymidylate synthase (TS), thereby reducing DNA synthesis and cell proliferation and inducing cell death.

with 5% 5-FU cream twice a day for 9 weeks, 92% of patients achieved complete clearance over a mean follow-up period of 55 months.²⁶

The above results clearly show that numerous NMSC lesions are resistant to treatment with 5-FU. However, in order to be able to predict—and resolve—resistance problems, it is essential to understand the mechanisms by which 5-FU induces apoptosis and why certain tumors do not respond.²⁰

One study described the case of a patient with severe dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency who developed severe gastrointestinal and hematological toxicity following treatment with a standard dose of 5-FU for BCC. DPD is the first enzyme involved in the degradation of 5-FU.²⁹ Approximately 10% of topical 5-FU is absorbed through the skin while over 80% is inactivated in the liver by DPD, explaining why its deficiency causes toxicity. In the case of colorectal cancer, however, patients with low DPD levels respond better to 5-FU, suggesting that DPD alterations and polymorphisms could be one cause of resistance.²⁹

Increased expression of the Bag-1 protein has been observed in progressive, metastatic oral SCC. This protein has an antiapoptotic function associated with the 70-kDa heat shock protein (Hsp70), indicating that overexpression of these 2 proteins would increase tumor cell resistance to apoptosis.³⁰ In one study, the elimination of Bag-1 from the cutaneous SCC cell line SCC-13 was found to increase sensitivity to 5-FU-induced apoptosis.³¹ The same study demonstrated overexpression of both Bag-1 and Hsp70 in a series of tumors, leading the authors to hypothesize that resistance to 5-FU in SCC might be mediated through a cytoplasmic Hsp70-dependent mechanism.

A final theory on 5-FU resistance is related to cancer stem cells in tumors of epithelial origin. According to this theory, malignant tumors, just like normal epidermis, would contain

“stem cells” responsible for proliferation that would give rise to more differentiated tumor cells that would form the bulk of the tumor. Like regular stem cells, cancer stem cells have a slow cell cycle. It is therefore considered that they might be responsible for resistance to classic chemotherapy drugs that typically target proliferating cells.³²

Key point: PDP alterations and polymorphisms and overexpression of Bag-1 and Hsp70 could influence sensitivity to 5-FU treatment.

Resistance to Imiquimod

Imiquimod is a synthetic compound of the imidazoquinoline family that acts as an immunomodulator, stimulating both innate and acquired immune responses. The immune response is modified through the toll-like receptor 7 (TLR7) and TLR8 pathways; these receptors are located on the surface of antigen-presenting cells, such as dendritic cells, macrophages, Langerhans cells, etc. The activation of these pathways triggers the production and release of numerous cytokines and chemokines, tumor necrosis factor (TNF) α , interferon (IFN) γ , certain interleukins (ILs), and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and attracts natural killer (NK) cells, thereby eliciting an innate and acquired immune response (Fig. 2). Imiquimod is thus a potent antiviral and antitumor agent, and is used widely in the field of dermatology, particularly in the treatment of malignant cutaneous lesions.^{2,26,33–37}

Numerous studies have shown that imiquimod also inhibits the growth of new blood vessels thanks to its antiangiogenic properties. It induces an increase in IL-10 and IL-12 levels, which inhibit angiogenesis, reduce cell production of proangiogenic factors (such as fibroblast growth factor and IL-8), inhibit vascular motility, and

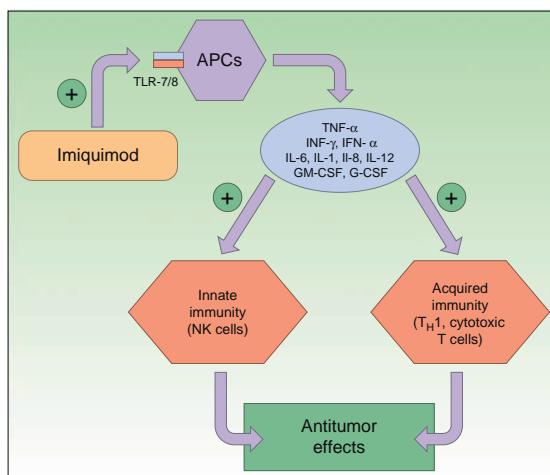


Figure 2 Mechanism of action of imiquimod. This immunomodulator acts by blocking TLR7 and TLR8, triggering the release of proinflammatory and antimicrobial cytokines and stimulating innate and acquired immunity, with antitumor effects. APCs indicates antigen-presenting cells; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IL, interleukin; INF, interferon; NK, natural killer; T_H1 , type 1 helper T cells; TLR, toll-like receptor; TNF, tumor necrosis factor.

induce endothelial apoptosis.²⁶ There is also evidence that imiquimod induces keratinocyte apoptosis, thereby favoring cytochrome C release and caspase 3 activation.³⁸

Imiquimod 5% cream is approved by the US Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA) for the treatment of external genital warts, superficial BCC, and AK.^{33,39} It is applied 3 to 5 times a week for 4 to 16 weeks depending on whether it is used to treat AK or BCC.⁴⁰

Imiquimod has also been used to treat other types of NMSC, such as Bowen disease, Bowenoid papulosis, extramammary Paget disease, melanoma in situ, and keratoacanthoma, among others.³⁸

Because surgery generally produces better results than topical treatments in skin lesions, imiquimod is mainly used in patients who are not candidates for surgery.³³

Gupta et al.⁴¹ undertook a meta-analysis of 4 studies involving 393 patients to evaluate the effectiveness of imiquimod 5% for the treatment of AK, and described an average efficacy rate of 70% (with a 95% confidence interval of $\pm 12\%$). A later study of 479 patients investigated the efficacy of the 2.5% and 3.75% formulations applied once a day for two 2-week periods separated by 2 weeks with no treatment. After 8 weeks of follow-up, the respective complete and partial response rates were 30.6% and 48.1% for imiquimod 2.5% and 35.6% and 59.4% for imiquimod 3.5%.⁴²

Waalboer-Spuij et al.³⁷ undertook a clinical trial in which 118 patients with AK were treated with imiquimod 5% once daily for 3 days a week over a month. After this period, 58% of patients required a second monthly cycle due to a lack

of response. After 16 weeks of follow-up, the complete and partial response rates were 46% and 35%, respectively.

Very little is known about the efficacy of imiquimod in SCC, as it is not approved for this condition. In one study, curettage followed by application of imiquimod resulted in a 95% response rate at 12 weeks.⁴³ In another study in which imiquimod only was applied for 9 to 12 weeks, the response rates were 71% for SCC and 57% to 80% for Bowen disease.⁴⁰

Numerous studies have analyzed the use of imiquimod 5% in BCC using different application regimens, ranging from twice-daily to twice-weekly application, with follow-up times of 1 to 5 years. The cure rates oscillated between 42% and 100% and the most effective regimen was the twice-daily application. Most recurrences were seen in the first or second year after treatment.^{44,45}

Cure rates for imiquimod are lower in the case of nodular BCC, with one study reporting a rate of 85.6% at 12 months for a regimen in which imiquimod was applied daily for 12 weeks.⁴⁶

The TLR7 gene, located on chromosome X, has been investigated as a possible factor in resistance to imiquimod. In a study of 34 patients with BCC (28 responders and 6 non-responders), Plaserico et al.⁴⁷ reported that the presence of the T allele for the TLR7 polymorphism rs179008/Gln11Leu might be a resistance factor. Hemizygous males carrying this polymorphism have been found to have lower levels of TNF- α following imiquimod stimulation.⁴⁸

Key point: Certain polymorphisms in the TLR7 gene might cause resistance to imiquimod, and reduced TNF- α levels have been proposed as a possible mechanism.

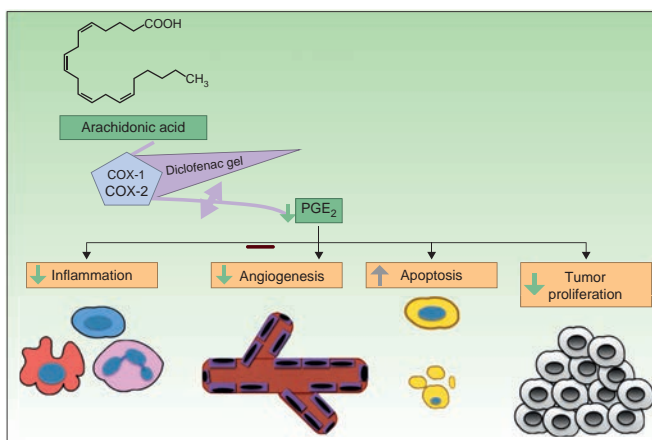


Figure 3 Inhibition of COX-2 by diclofenac, leading to decrease in PGE₂ and its functions (e.g., angiogenesis, tumor proliferation, and inflammation), favoring apoptosis. COX indicates cyclooxygenase; PGE₂, prostaglandin E₂.

Resistance to Diclofenac

Diclofenac is a nonsteroidal anti-inflammatory drug that reduces the production of prostaglandins through inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2) (Fig. 3). There is evidence that COX-2 has an important role in the development and progression of NMSC. COX-2 permits the formation of prostaglandin E₂ (PGE₂), which in turn enhances tumor proliferation, angiogenesis, and inflammation, and inhibits apoptosis. COX-2 inhibition is thought to achieve the opposite effect, but its mechanism of action in skin cancer cells is unknown. Diclofenac 3% in hyaluronic acid 2.5% (Solaraze) is available as a topical gel approved by the FDA and EMA for the treatment of AK. It is applied twice daily for 60 to 90 days. Although there are studies supporting the use of topical diclofenac in AK,^{49–52} and to a lesser extent Bowen disease,^{53,54} there are no data on its effectiveness in the treatment of BCC or invasive SCC.⁴⁰

Complete response rates for AK treated with diclofenac vary widely, with figures ranging from 33% to 81% depending on the study, and there is even one study in which diclofenac failed to produce clinically significant improvements in 130 patients.^{55–59} There are therefore patients who do not respond to diclofenac and/or who develop recurrences.

The mechanisms of action underlying diclofenac resistance in AK are not clear. Considering the similarities between AK and SCC (mutated p53 and overexpression of COX-2), Rodust et al.⁶⁰ used 4 cutaneous SCC cell lines as a model to study resistance to diclofenac in AK. Three of the lines were sensitive to the proapoptotic effects associated with diclofenac-induced caspase activation, while the fourth was resistant. Treatment of diclofenac-sensitive cells produced the characteristic proapoptotic effects at the level of the B-cell lymphoma proteins (Bcl-2) and resulted

in the increased expression of Bad (proapoptotic) and the decreased expression of myeloid cell leukemia 1 (Mcl-1) and Bcl-w (both antiapoptotic). However, in the resistant line, the lack of COX-2 prior to treatment with diclofenac was already associated with low levels of Mcl-1 and Bcl-w and high levels of Bad, possibly due to the lack of PEG₂ in the cells. In such a situation, diclofenac would be unable to exert its proapoptotic effects. However, these resistant cells were also seen to contain underexpressed levels of Noxa and Puma, 2 proapoptotic members of the Bcl-2 family, overall, possibly favoring a COX-2-independent antiapoptotic response to diclofenac.

Key point: The lack of response to diclofenac in SCC cells appears to be independent of pathways that modulate apoptosis through COX-2 in SCC cells.

Resistance to Ingenol Mebutate

Ingenol mebutate is a natural extract of *Euphorbia peplus* that has been used for many years to treat different skin conditions, such as viral warts and tumors.⁶¹ It has a dual mechanism of action. On the one hand, it rapidly induces apoptosis (in a matter of hours) by necrosis of dysplastic keratinocytes through mitochondrial damage and plasma membrane disruption,⁶² and on the other hand, several days later, it triggers an inflammatory response through protein kinase C δ (PKC), with the production of proinflammatory cytokines and tumor-specific antibodies that cause neutrophil-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity (Fig. 4).⁶³

Topical ingenol mebutate gel is approved for the treatment of AK in 2 concentrations: 0.015% applied once daily for 3 days for lesions on the head and 0.05% applied once daily for just 2 days for lesions on the trunk.⁶⁴ The gel has also been used to treat other cutaneous disorders such as BCC,⁶

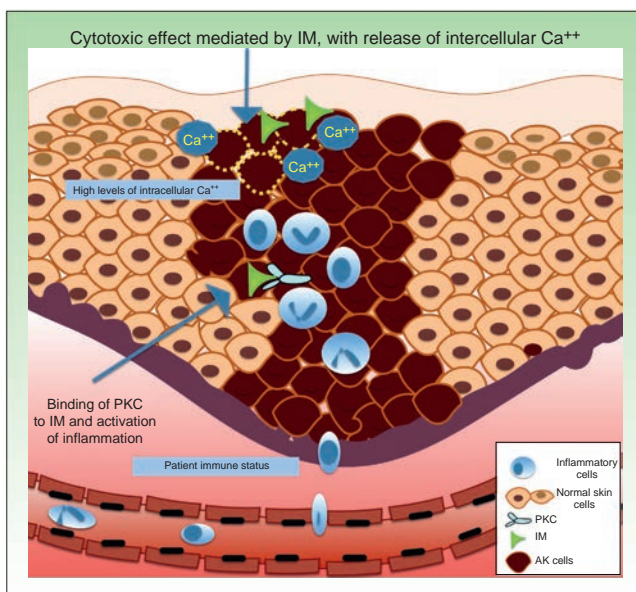


Figure 4 Mechanisms possibly involved in resistance to IM treatment are intracellular Ca^{++} levels, at the level of receptor binding and immune status of the patient. AK indicates actinic keratosis; Ca^{++} , calcium; IM, ingenol mebutate, PKC, protein kinase C.

Bowen disease,⁷ giant parokeratosis (1 case),⁶⁵ anogenital warts,⁶⁶ and even recurrent melanoma *in situ*.⁶⁷

In the case of AK, ingenol mebutate has resulted in complete response rates of 42.2% for lesions on the face and neck and 34.1% for lesions on the trunk and extremities.⁶⁸

Regarding factors that might influence resistance to the acute cytotoxic effects of ingenol mebutate, it has been postulated that this substance might trigger the release of calcium from the endoplasmic reticulum rather than an influx of calcium from outside the cell. Differentiated human keratinocytes have high calcium levels, and are significantly less sensitive to ingenol mebutate-mediated cell death than undifferentiated, proliferating keratinocytes with lower calcium content.^{62,69}

Neutrophil recruitment might also have a role in resistance to ingenol mebutate. Preclinical studies have investigated the inflammatory effect of ingenol mebutate in neutrophil-depleted Foxn1^{nu} mice (nude mice with an autosomal recessive mutation in the FOXN1 [forkhead box N1] gene associated with T-cell immunodeficiency, alopecia, and onychodystrophy) and in CD18-deficient mice (mice with deficient leukocyte cell adhesion molecule expression).⁷⁰ Both groups of mice were injected with cells from the UV-induced murine SCC line LK2, and a significant increase in tumor relapse rates (>70%) was observed after several weeks in the absence of neutrophil-mediated killing of residual tumor cells. The authors concluded that an individual's

immune status could contribute to resistance to ingenol mebutate treatment.⁷⁰

Key point: An immune state characterized by T cell-deficiency, polymorphonuclear neutrophil deficiency, and other factors such as intracellular calcium levels could influence sensitivity to treatment with ingenol mebutate.

Conclusions

In recent years, we have witnessed an increase in the number of topical treatments available for NMSC, largely due to the introduction of a new class of drugs known as topical immunomodulators. The use of these immunomodulators has given rise to studies of resistance mechanisms showing that resistance could depend on the patient's immune status and on the biochemical and molecular features of the tumor cells.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. European Medicines Agency [accessed 2 Oct 2015]. Available at: <http://www.ema.europa.eu>

2. Bubna AK. Imiquimod —its role in the treatment of cutaneous malignancies. *Indian J Pharmacol*. 2015;47:354–9.
3. Fluoracil [accessed 5 Oct 2015]. Available at: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fluorouracil>
4. Love WE, Bernhard JD, Bordeaux JS. Topical imiquimod or fluorouracil therapy for basal and squamous cell carcinoma: A systematic review. *Arch Dermatol*. 2009;145:1431–8.
5. Gracia-Cazaña T, López MT, Oncins R, Gilaberte Y. Successful treatment of sequential therapy in digital Bowen's disease with methyl aminolevulinate photodynamic therapy and topical diclofenac 3% in hyaluronan 2.5% gel. *Dermatol Ther*. 2015;28:341–3.
6. Cantisani C, Paolino G, Cantoresi F, Faina V, Richetta AG, Calvieri S. Superficial basal cell carcinoma successfully treated with ingenol mebutate gel 0.05%. *Dermatol Ther*. 2014;27:352–4.
7. Braun SA, Homey B, Gerber PA. [Successful treatment of Bowen disease with ingenol mebutate]. *Hautarzt*. 2014;65:848–50.
8. Fernández-Guarino M, García-Morales I, Harto A, Montull C, Pérez-García B, Jaén P. Terapia fotodinámica: nuevas indicaciones. *Actas Dermosifiliogr*. 2007;98:377–95.
9. Xie J, Bartels CM, Barton SW, Gu D. Targeting hedgehog signaling in cancer: Research and clinical developments. *Onco Targets Ther*. 2013;6:1425–35.
10. Maubec E, Petrow P, Du villard P, Lauouenan C, Duval X, Lacroix L, et al. Cetuximab as first-line monotherapy in patients with skin unresectable squamous cell carcinoma: Final results of a phase II multicenter study. *J Clin Oncol*. 2010;28:8510.
11. Wolfina U. Update of cetuximab for non-melanoma skin cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2014;14:271–6.
12. Martorell-Calatayud A, Requena C, Nagore E, Sanmartín O, Serra-Guillén C, Botella-Estrada R, et al. Ensayo clínico: la infiltración intralesional con metotrexato de forma neoadyuvante en la cirugía del queratoacantoma permite obtener mejores resultados estéticos y funcionales. *Actas Dermosifiliogr*. 2011;102:605–15.
13. Salido-Vallejo R, Garnacho-Saucedo G, Sánchez-Arca M, Moreno-Giménez JC. Neoadjuvant intralesional methotrexate before surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the lower lip. *Dermatol Surg*. 2012;38:1849–50.
14. Juarranz de la Fuente A. Factores celulares implicados en resistencia a terapia fotodinámica en carcinoma escamoso. *Piel*. 2014;29 Supl. 1:2–3.
15. Perona R, Sánchez-Pérez I. Signalling pathways involved in clinical responses to chemotherapy. *Clin Transl Oncol*. 2007;9:625–33.
16. Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: Causes and consequences. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1805:105–17.
17. Zamarrón A, Lucena SR, Salazar N, Sanz-Rodríguez F, Jaén P, Gilaberte Y, et al. Isolation and characterization of PDT-resistant cancer cells. *Photochem Photobiol Sci*. 2015;14:1378–89.
18. Zamarrón A, Lucena S, Salazar N, Jaén P, González S, Gilaberte Y, et al. Isolation and initial characterization of resistant cells to photodynamic therapy. In: Rapozzi V, Jori G, editors. *Resistance to photodynamic therapy in cancer*. Suiza: Springer; 2015. p. 117–45.
19. Lucena SR, Salazar N, Gracia-Cazaña T, Zamarrón A, González S, Juarranz A, et al. Combined treatments with photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer. *Int J Mol Sci*. 2015;16:25912–33.
20. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:330–8.
21. Nikkhah D, Abood A, Watt D. Cicatricial ectropion: A complication of 5-fluorouracil. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2012;65:e9–10.
22. Micali G, Lacarrubba F, Nasca MR, Schwartz RA. Topical pharmacotherapy for skin cancer: Part I. Pharmacology. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70:965.
23. Aguayo-Leiva IR, Ríos-Buceta L, Jaén-Olasolo P. Tratamiento quirúrgico vs no quirúrgico en el carcinoma basocelular. *Actas Dermosifiliogr*. 2010;101:683–92.
24. Firthhaber JM. Diagnosis and treatment of basal cell and squamous cell carcinoma. *Am Fam Physician*. 2012;86:161–8.
25. Gross K, Kirck L, Ricorian KG. 5% 5-Fluorouracil cream for the treatment of small superficial basal cell carcinoma: Efficacy, tolerability, cosmetic outcome, and patient satisfaction. *Dermatol Surg*. 2007;33:433–9.
26. Micali G, Lacarrubba F, Nasca MR, Ferraro S, Schwartz RA. Topical pharmacotherapy for skin cancer: Part II. Clinical applications. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70:979.
27. Ishioka P, Mala M, Rodrigues SB, Marta AC, Hirata SH. Evaluation of the therapeutic results of actinic keratosis treated with topical 5% fluorouracil by reflectance confocal laser microscopy: Preliminary study. *An Bras Dermatol*. 2015;90:426–9.
28. Morton C, Horn M, Leman J, Tack B, Bedane C, Tjioe M, et al. Comparison of topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy with cryotherapy or fluorouracil for treatment of squamous cell carcinoma in situ: Results of a multicenter randomized trial. *Arch Dermatol*. 2006;142:729–35.
29. Johnson MR, Hageboutros A, Wang K, High L, Smith JB, Diaslo RB. Life-threatening toxicity in a dihydropyrimidine dehydrogenase-deficient patient after treatment with topical 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res*. 1999;5:2006–11.
30. Weber A, Henge UR, Stricker I, Tischoff I, Markwart A, Anhalt K, et al. Protein microarrays for the detection of biomarkers in head and neck squamous cell carcinomas. *Hum Pathol*. 2007;38:228–38.
31. Wood J, Pring M, Eveson JW, Price N, Proby CM, Hague A. Co-overexpression of Bag-1 and heat shock protein 70 in human epidermal squamous cell carcinoma: Bag-1-mediated resistance to 5-fluorouracil-induced apoptosis. *Br J Cancer*. 2011;104:1459–71.
32. Han L, Shi S, Gong T, Zhang Z, Sun X. Cancer stem cells: Therapeutic implications and perspectives in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2013;3:65–75.
33. Bangash HK, Colegio OR. Management of non-melanoma skin cancer in immunocompromised solid organ transplant recipients. *Curr Treat Options Oncol*. 2012;13:354–76.
34. Knackstedt TJ, Quitadamo M. Imiquimod induces sustained remission of actinic damage: A case report spanning one decade of observation. *Cutis*. 2015;95:20–3.
35. De Macedo EM, Carneiro RC, de Lima PP, Silva BG, Matayoshi S. Imiquimod cream efficacy in the treatment of periorcular nodular basal cell carcinoma: A non-randomized trial. *BMC Ophthalmol*. 2015;15:35.
36. Sohn KC, Li ZJ, Choi DK, Zhang T, Lim JW, Chang IK, et al. Imiquimod induces apoptosis of squamous cell carcinoma (SCC) cells via regulation of A20. *PLoS One*. 2014;9:95337.
37. Waalboer-Spijij R, Holterhues C, van Hattem S, Schutteelaar ML, Gastra MT, Kuijpers DJ, et al. Patient perception of imiquimod treatment for actinic keratosis and superficial basal cell carcinoma in 202 patients. *Dermatology*. 2015;231:56–62.
38. Chakrabarty A, Geisse JK. Medical therapies for non-melanoma skin cancer. *Clin Dermatol*. 2004;22:183–8.
39. Kopera D, Kerl H. Visualization and treatment of subclinical actinic keratoses with topical imiquimod 5% cream: An observational study. *Biomed Res Int*. 2014;2014:135916.
40. Bahner JD, Bordeaux JS. Non-melanoma skin cancers: Photodynamic therapy, cryotherapy, 5-fluorouracil, imiquimod, diclofenac, or what? Facts and controversies. *Clin Dermatol*. 2013;31:792–8.
41. Gupta AK, Davey V, Mcphail H. Evaluation of the effectiveness of imiquimod and 5-fluorouracil for the treatment of actinic

- keratosis: Critical review and meta-analysis of efficacy studies. *J Cutan Med Surg.* 2005;9:209–14.
42. Swanson N, Smith CC, Kaur M, Goldenberg G. Imiquimod 2.5% and 3.75% for the treatment of actinic keratoses: Two phase 3, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled studies. *J Drugs Dermatol.* 2014;13:166–9.
 43. Tillman DK Jr, Carroll MT. Topical imiquimod therapy for basal and squamous cell carcinomas: A clinical experience. *Cutis.* 2007;79:241–8.
 44. Chitwood K, Etzkorn J, Cohen G. Topical and intralesional treatment of nonmelanoma skin cancer: Efficacy and cost comparisons. *Dermatol Surg.* 2013;39:1306–16.
 45. Arits AH, Mosterd K, Essers BA, Spoorenberg E, Sommer A, de Rooij MJ, et al. Photodynamic therapy versus topical imiquimod versus topical fluorouracil for treatment of superficial basal-cell carcinoma: A single blind, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2013;14:647–54.
 46. Bath-Hextall F, Ozolins M, Armstrong SJ, Colver GB, Perkins W, Miller PS, et al. Surgical excision versus imiquimod 5% cream for nodular and superficial basal-cell carcinoma (SINS): A multicentre, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2014;15:96–105.
 47. Piaserico S, Michelotto A, Frigo AC, Alaibac M. TLR7 Gln11Leu single nucleotide polymorphism and response to treatment with imiquimod in patients with basal cell carcinoma: A pilot study. *Pharmacogenomics.* 2015;16:1913–7.
 48. Clifford HD, Hayden CM, Khoo SK, Naniiche D, Mandomando IM, Zhang G, et al. Polymorphisms in key innate immune genes and their effects on measles vaccine responses and vaccine failure in children from Mozambique. *Vaccine.* 2012;30:6180–5.
 49. Russo G. Actinic keratosis, basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma: Uncommon treatments. *Clin Dermatol.* 2005;23:581–6.
 50. Gebauer K, Brown P, Varigos G. Topical diclofenac in hyaluronan gel for the treatment of solar keratoses. *Austr J Dermatol.* 2003;44:40–3.
 51. Del Rosso JQ. New and emerging topical approaches for actinic keratoses. *Cutis.* 2003;72:273–9.
 52. Lang P. Management of actinic keratoses. *Comp Ther.* 2003;29:108–14.
 53. Dawe SA, Salisbury JR, Higgins E. Two cases of Bowen's disease successfully treated topically with 3% diclofenac in 2.5% hyaluronan gel. *Clin Exp Dermatol.* 2005;30:712–3.
 54. Patel MJ, Stockfleth E. Does progression from actinic keratosis and Bowen's disease end with treatment: Diclofenac 3% gel, an old drug in a new environment? *Br J Dermatol.* 2007;156 Suppl. 3:53–6.
 55. Rivers JK, McLean DI. An open study to assess the efficacy and safety of topical 3% diclofenac in a 2.5% hyaluronic acid gel for the treatment of actinic keratoses. *Arch Dermatol.* 1997;133:1239–42.
 56. McEwan LE, Smith JG. Topical diclofenac/hyaluronic acid gel in the treatment of solar keratoses. *Australas J Dermatol.* 1997;38:187–9.
 57. Wolf JE Jr, Taylor JR, Tschien E, Kang S. Topical 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronan gel in the treatment of actinic keratoses. *Int J Dermatol.* 2001;40:709–13.
 58. Rivers JK, Arlette J, Shear N, Guenther L, Carey W, Poulin Y. Topical treatment of actinic keratoses with 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronan gel. *Br J Dermatol.* 2002;146:94–100.
 59. Akarsu S, Aktan S, Atahan A, Koç P, Özkan S. Comparison of topical 3% diclofenac sodium gel and 5% imiquimod cream for the treatment of actinic keratoses. *Clin Exp Dermatol.* 2011;36:479–84.
 60. Rodust PM, Fecker LF, Stockfleth E, Eberle J. Activation of mitochondrial apoptosis pathways in cutaneous squamous cell carcinoma cells by diclofenac/hyaluronic acid is related to upregulation of Bad as well as downregulation of Mcl-1 and Bcl-w. *Exp Dermatol.* 2012;21:520–5.
 61. Ramsay JR, Suhrbier A, Aylward JH, Ogbourne S, Cozzi SJ, Poulsen MG, et al. The sap from *Euphorbia peplus* is effective against human nonmelanoma skin cancers. *Br J Dermatol.* 2011;164:633–6.
 62. Ogbourne SM, Suhrbier A, Jones B, Cozzi SJ, Boyle GM, Morris M, et al. Antitumor activity of 3-ingenyl angelate: Plasma membrane and mitochondrial disruption and necrotic cell death. *Cancer Res.* 2004;64:2833–9.
 63. Kedeei N, Lundberg DJ, Toth A, Welburn P, Garfield SH, Blumberg PM. Characterization of the interaction of ingenol 3-angelate with protein kinase C. *Cancer Res.* 2004;64:3243–55.
 64. Berman B. New developments in the treatment of actinic keratosis: Focus on ingenol mebutate gel. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2012;5:111–22.
 65. Kindem S, Serra-Guillén C, Sorni G, Guillén C, Sanmartín O. Treatment of porokeratosis of Mibelli with ingenol mebutate: A possible new therapeutic option. *JAMA Dermatol.* 2015;151:85–6.
 66. Schopf RE. Ingenol mebutate gel is effective against anogenital warts - a case series in 17 patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016;30:1041–3.
 67. Mansuy M, Nikkels-Tassoudji N, Arrese JE, Rorive A, Nikkels AF. Recurrent in situ melanoma successfully treated with ingenol mebutate. *Dermatol Ther (Heidelberg).* 2014;4:131–5.
 68. Lebwohl M, Swanson N, Anderson LL, Melgaard A, Xu Z, Berman B. Ingenol mebutate gel for actinic keratosis. *N Engl J Med.* 2012;366:1010–9.
 69. Stahlhut M, Lord JM, Bertelsen M, Worm J, Hampson P, Chahal H, et al. Ingenol mebutate initiates multiple specific cell death pathways in human cancer cells. Poster n.º P5517, presented at: Annual Meeting of the American Academy of Dermatology; 16-20 marzo, 2012; San Diego, CA.
 70. Challacombe JM, Suhrbier A, Parsons PG, Jones B, Hampson P, Kavanagh D, et al. Neutrophils are a key component of the antitumor efficacy of topical chemotherapy with ingenol-3-angelate. *J Immunol.* 2006;177:8123–32.



ACTAS Derma-Sifiliográficas

Full English text available at
www.actasdermo.org



REVIEW

Resistance of Nonmelanoma Skin Cancer to Nonsurgical Treatments. Part II: Photodynamic Therapy, Vismodegib, Cetuximab, Intralesional Methotrexate, and Radiotherapy[☆]

T. Gracia-Cazaña,^{a,b,*} N. Salazar,^c A. Zamarrón,^c M. Mascaraque,^c
S.R. Lucena,^c A. Juarraz^c

^a Unidad de Dermatología, Hospital de Barbastro, Barbastro, Huesca, Spain

^b Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza, Spain

^c Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Received 16 January 2016; accepted 30 April 2016

KEYWORDS

Skin cancer;
Cetuximab;
Vismodegib;
Photodynamic
therapy;
Radiotherapy;
Methotrexate;
Drug resistance

Abstract A wide range of treatments is now available for nonmelanoma skin cancer, including 5-fluorouracil, ingenol mebutate, imiquimod, diclofenac, photodynamic therapy, methotrexate, cetuximab, vismodegib, and radiotherapy. All are associated with high clinical and histologic response rates. However, some tumors do not respond due to resistance, which may be primary or acquired. Study of the resistance processes is a broad area of research that aims to increase our understanding of the nature of each tumor and the biologic features that make it resistant, as well as to facilitate the design of new therapies directed against these tumors. In this second article, having covered the topical treatments of nonmelanoma skin cancer, we review resistance to other nonsurgical treatments, such as monoclonal antibodies against basal and squamous cell carcinomas, intralesional chemotherapy, photodynamic therapy, and radiotherapy.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. and AEDV. All rights reserved.

[☆] Please cite this article as: Gracia-Cazaña T. Resistencias al tratamiento no quirúrgico en cáncer cutáneo no melanoma. Parte II: terapia fotodinámica, vismodegib, cetuximab, metotrexate intralesional y radioterapia. Actas Dermosifiliogr. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ad.2016.04.020>

* Corresponding author.

E-mail addresses: tamgracaz@gmail.com, tamara.gracia@hotmail.com (T. Gracia-Cazaña).

PALABRAS CLAVE

Cáncer cutáneo;
Cetuximab;
Vismodegib;
Terapia fotodinámica;
Radioterapia;
Metotrexato;
Resistencia a
fármacos

Resistencia al tratamiento no quirúrgico en cáncer cutáneo no melanoma. Parte II: terapia fotodinámica, vismodegib, cetuximab, metotrexato intralesional y radioterapia

Resumen En la actualidad existe una amplia variedad de tratamientos para el cáncer cutáneo no melanoma, como son 5-fluoracilo, mebuto de ingenol, imiquimod, diclofenaco, terapia fotodinámica, metotrexato, cetuximab, vismodegib, radioterapia, todos ellos con altas tasas de respuesta clínica e histológica. Sin embargo, algunos tumores no responden al tratamiento, debido a la aparición de resistencias, tanto primarias como adquiridas. El estudio de los procesos de resistencia es un campo extenso de investigación que conlleva a ampliar los conocimientos de la naturaleza de cada tumor, las características biológicas que lo hacen resistente y el diseño de nuevas terapias dirigidas contra los mismos. En este segundo trabajo se revisan las resistencias descritas a otros tratamientos no quirúrgicos frente al cáncer cutáneo no melanoma, diferentes a los tratamientos tópicos, como son diferentes anticuerpos monoclonales frente a CBC y CEC, la quimioterapia intralesional, la terapia fotodinámica y la radioterapia.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. y AEDV. Todos los derechos reservados.

Introduction

Skin cancer is the most common malignancy in the white population. The most common types include basal cell carcinoma (BCC) and squamous cell carcinoma (SCC), followed at a distance by melanoma. According to statistical analyses, the incidence of these 3 skin cancers has increased worldwide in the last 20 years, although mortality rates have remained stable. An incidence of 2.53 cases per 1000 population per year has been reported for BCC.¹ However, according to a recent study, the annual incidence of non-melanoma skin cancer (NMSC) is underestimated, at 113 cases per 100 000 population for BCC and 38 cases per 100 000 population for SCC.²

Surgery is the most common treatment for NMSC, and in most cases it is curative. Nonetheless, 15.7% of NMSCs have positive margins³ and complete excision is associated with a recurrence rate of 4.2%, although lower rates have been described for excision with wide margins, albeit with large surgical defects.⁴

As mentioned in the first part of this review, a wide range of alternatives to surgery have emerged in recent years in the form of topical treatments and, even more recently, targeted therapies such as vismodegib and cetuximab, without forgetting of course other treatments that already existed, such as photodynamic therapy (PDT), radiotherapy, and even intralesional chemotherapy. One of the main reasons for treatment failure in cancer is resistance. The study of clinical, histologic, and biologic differences in responses to different treatments enhances our understanding of the mechanisms involved in resistance in NMSC and will help to achieve improved efficacy and efficiency by identifying patients who are more likely to respond favorably to a given treatment.

In this article, we discuss the main mechanisms that have been investigated in treatment resistance in NMSC. The mechanisms described for PDT, vismodegib, and cetuximab are summarized in Table 1.

Resistance to PDT

PDT takes advantage of the photosensitizing properties of certain compounds that are activated by light and that, in the presence of molecular oxygen (O_2), generate reactive oxygen species (ROS) that induce cell death (Fig. 1). The treatment has 3 basic components: a photosensitizing agent, light, and O_2 .^{5,6}

The antitumor properties of PDT are the result of direct cytotoxic effects on the tumor cells and indirect effects on the tumor stroma. Treatment also produces inflammation and elicits an immune response against the tumor, which is essential to achieve long-term control.^{5,7,8}

The main photosensitizing agents approved for use in skin cancer in Europe are 5-aminolevulinic acid (ALA, Ameluz) and its methylated derivative MAL (Metvix). Both

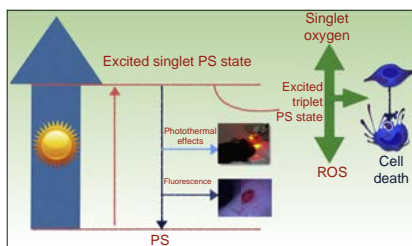


Figure 1 Mechanism of action of photodynamic therapy. The absorption of light by a photosensitizer (PS) promotes an electron to a higher-energy orbit (excited singlet PS state), and the spin angular momentum of this electron is then reversed, causing an excited triplet PS state. The longer lifetime of the triplet state favors the generation of free radicals and/or singlet oxygen, which damage key cell structures and ultimately cause cell death. ROS indicates reactive oxygen species.

Table 1 Summary of Efficacy Rates and Resistance Mechanisms Described for Photodynamic Therapy, Vismodegib, and Cetuximab.

	Efficacy	Resistance-Related Variables
Photodynamic therapy	Complete response in BCC: 91% at 3 mo and 76% at 5 y. ¹⁰ Recurrence at 24 mo: 15%. ¹³ Complete response in Bowen disease: 86%-93% at 3 mo and 68%-71% at 24 mo. ¹⁰ Recurrence at 12 mo: 5%. ¹⁴ Complete response in AK: 69%-91% at 3 mo. ¹² Recurrence at 12 mo: 25%. ¹⁵	Thickness tumor (> 2 mm) ²⁰ Histologic subtypes (pigmented, morpheaform, and infiltrative BCC, infiltrative growth pattern) ^{15,22,23} Ulceration ²³ Hyperkeratosis ²⁴ Certain locations in BCC (face and scalp) ²⁹ Mutations in p53 ^{37,38} ; overexpression of cyclin D1 ^{38,39} ; alterations to Wnt/B-catenin pathway ^{38,39} ; mutations in PTCH1 ^{38,39} ; altered expression of P-glycoprotein ⁴⁰⁻⁴⁴ Activation of MAPK and Nrf2 pathways ^{45,46} Autophagy and reduction of immune effector mechanisms ⁴⁸ Changes to cytoskeleton and cell adhesion proteins ⁴⁹ PDT-induced cytoprotective effect of nitric oxide ^{50,51} Low dose of ROS with stimulation of tumor cells ⁵⁹
Vismodegib	Partial response in metastatic BCC: 30.3% Mean duration of response: 7.6 mo ⁷³ Complete and partial response in locally advanced BCC: 20.6% and 22.2% respectively. Mean duration of response: 7.6 mo ⁷³	Mutations in PTCH1 ⁷⁵ Mainly mutations in SMO Copy-number variations in <i>Sufu</i> and <i>Gli</i> ⁷⁹ Mutations in cyclin D1 (<i>CCND1</i>) ^{76,80} Compensatory upregulation of IGF-1R/PI3K ^{80,81}
Cetuximab	Complete response: 5% Partial response: 22.2% Disease control: 69%; median progression-free survival: 4.1 mo	Lack of mutations in RAS ¹⁰¹ Src activity and EGFR-dependent nuclear translocation of Src ¹⁰⁶ PTEN instability, Akt hyperactivation ¹⁰⁷ Increased expression of EGFR ligands ^{106,108} Upregulation of EGFR, HER2, and HER 33 ¹⁰⁹⁻¹¹²

Abbreviations: AK, actinic keratosis; BCC, basal cell carcinoma; EGFR, epidermal growth factor receptor; PDT, photodynamic therapy; ROS, reactive oxygen species.

are precursors of the endogenous photosensitizer protoporphyrin IX (PpIX), which is a metabolite in the heme pathway. This pathway is subject to negative feedback control, and therefore exogenously administered ALA or MAL results in the accumulation of PpIX in tumor cells. In Spain, MAL is approved for the treatment of actinic keratosis (AK), Bowen disease, superficial BCCs, and nodular BCCs with a depth of less than 2 mm, while ALA is approved only for the treatment of AK.^{5,9}

The advantages of PDT include high levels of complete response, with rates of 91% and 76% reported for BCC (at 3 months and 5 years, respectively) and of 86% to 93% and 68% to 71% for Bowen disease (at 3 and 24 months, respectively).¹⁰ In a study of AK, a single PDT session with ALA (Levulan and Kerastick) produced respective cure rates of 76% and 72% at 1 and 2 months posttreatment. These rates increased to 86% with the administration of a second session.¹¹ In another study, PDT with MAL (Metvix) achieved a lesion response rate of between 69% and 91% at 3 months.¹² Low recurrence has been reported for PDT with MAL, with reports of a 15% clearance rate for BCC at 24 months¹³ and a 5% and

25% rate for Bowen disease and AK, respectively, at 12 months.^{14,15}

Other advantages of PDT are that it can be combined with other treatments¹⁶ and repeated as often as necessary, not to mention of course that it is associated with excellent cosmetic results and high satisfaction rates among patients.¹⁷ It does, however, have some disadvantages, such as pain during illumination, the limited penetration capacity of both the photosensitizing agent and the light, and the risk of resistance, with occasional reports of refractory tumors.^{18,19}

Several clinical factors have been linked to resistance to PDT, but tumor thickness is the most widely studied factor, particularly in BCC. McKay et al.²⁰ reported that the likelihood of recurrence was greater in tumors thicker than 0.4 mm, and treatment guidelines do not recommend PDT for nodular BCCs with a thickness of over 2 mm.²¹

Within the histological subtypes of BCC, pigmented tumors are the most difficult to treat, as the melanin absorbs the light, leaving the deepest part of the tumor without the light it needs to trigger the photodynamic reaction, possibly giving rise to resistance.²² Morpheaform and infiltrative BCCs

are also more resistant to the penetration of the photosensitizer due to the increased density of collagen and cords of cells in the connective tissue; PDT is therefore not indicated in these tumors.¹⁵ Other factors that have been investigated include ulceration, an infiltrative growth pattern²³ and hyperkeratosis,²⁴ which can be a negative predictor of response.

According to some authors, giant tumors (>4 cm in the case of BCCs) can predict poor response to PDT.^{25,26} However, other authors have found tumor diameter to have no effect on response.^{27–30} In a study of Bowen disease, Calzavara-Pinton et al.³¹ found that tumor diameter was not a predictor of final response, but they did observe an association with recurrence.

BCCs on the face or scalp are associated with lower rates of complete response than lesions on the trunk or neck (54% vs 88% at 24 months).²⁹ Complete response rates are also lower in the H-zone of the face, regardless of tumor size.²⁹ Nevertheless, in AK, studies comparing PDT and cryotherapy have found that lesions on the extremities appear to be more resistant to MAL-PDT than lesions on the face or scalp.^{32,33}

Efficacy can also be affected by nonclinical factors. It is known, for example, that tumor cells do not always respond to the oxidative stress caused by PDT. These unresponsive cells are thought to be responsible for recurrent lesions that may become more aggressive. Resistance is generally thought to be due to intrinsic factors inherent to the tumor cells or extrinsic factors in the tumor environment, which has an important role in treatment response through the establishment of gradients in factors such as signaling, O₂, and metabolites.^{34,35}

Intrinsic resistance may be due to a complex set of factors, including aspects related to the expression of genes involved in the genesis of NMSC and other aspects related to the photodynamic process itself.³⁶ UV light-induced DNA mutations in tumor suppressor genes, such as p53, are common and have been described as early events in the carcinogenesis of 50% of BCCs and AKs and in 90% of SCCs.^{37,38} There have also been reports of cyclin D1 overexpression in almost 50% of cases of AK, alterations of the Wnt/ β -catenin signaling pathway (involved in SCC), and mutations in the PTCH1 gene (which codes for the Hedgehog [HH] protein receptor in BCC), possibly affecting response to PDT.^{38,39}

Another mechanism of interest is intracellular drug concentration, which is regulated by transporters such as P-glycoprotein (Pgp) responsible for transporting the drug out of the cell. While some studies have reported Pgp overexpression in epithelial cell lines such as M1A04 (a clonal population derived from the kidney of an African green monkey, *Cercopithecus aethiops*) and MCDK 60, and in K562 chronic myeloid leukemia cells made resistant to PDT by multiple treatment cycles, others have not.^{40–44}

The oxidative stress caused by PDT activates signaling cascades involved in survival, proliferation, and inhibition of apoptosis mediated by protein kinase B (PKB/Akt), nuclear factor κ (NF- κ B), mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), and cyclooxygenase-2 (COX-2), as well as genes involved in the antioxidant response pathway, such as the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) gene. COX-2, which participates in prostaglandin (PGE) synthesis and inflammatory responses^{45,46} is overexpressed in NMSC and is considered an

early marker of actinic damage. MAPK pathways can be activated by PDT and may have a relevant role in resistance to this treatment.³⁶

PDT also results in the activation of the Nrf2 pathway, which is the main regulator of cellular responses to oxidative stress. Nrf2 activates the transcription of genes with an AU-rich element (ARE) in their promoter region, such as glutathione S-transferase (GSH), NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1), hem oxygenase 1, and superoxide dismutase, among others. The corresponding enzymes would have a key role in neutralizing ROS and promoting detoxification, possibly favoring resistance to PDT.⁴⁷

Some studies have also reported an association between PDT resistance and autophagy, via the reduction of immune effector mechanisms,⁴⁸ and cytoskeleton and cell adhesion proteins.⁴⁹

Furthermore, it has been well established that nitric oxide mediates cell survival, growth, migration, and invasion in a wide variety of tumors. PDT induces nitric oxide production in the tumor and tumor microenvironment. Low levels of nitric oxide exert a cytoprotective effect by activating NF- κ B/Snail YY1, enhancing survival/antiapoptosis and inhibiting the antiapoptotic/proapoptotic and metastasis suppressor Raf kinase inhibitory protein (RKIP).^{50,51}

Few publications have analyzed the mechanisms that determine poor tumor response to PDT and even fewer have analyzed these in NMSC, although it is an area of growing research interest. Numerous studies have shown resistance to PDT in preclinical studies using cell and animal models,^{40–43,52–54} and also in patients.^{19,55,56} Our group observed resistance to MAL-PDT in murine keratinocyte cultures (Pam-212) with activation of the PI3K/Akt pathway.⁵⁷ Activation of the PI3K/Akt⁵⁸ and MAPK/ERK pathways has been identified in PDT-resistant cells isolated from the human SCC cell line SCC-13 and points to a possible relationship with the more aggressive nature of invasive SCCs in patients who have undergone PDT.¹⁹

Finally, PDT with low doses of MAL has been found to stimulate ROS-mediated growth of cultured cells,⁵⁹ adding some strength to the hypothesis that low doses of ROS could stimulate the growth of tumor cells in areas that receive an insufficient PDT dose.

Key point: Diverse resistance mechanisms have been described for PDT. These include clinical factors, such as tumor thickness, size, location; histologic subtype; and molecular factors such as Pgp overexpression, MAPK pathway alterations, resistance secondary to Nrf2 and activation of the transcription of genes with an ARE in their promoter regions; autophagy and reduced immune effector mechanisms; and a PDT-induced cytoprotective effect of nitric oxide that activates NF- κ B/Snail YY1 and inhibits RKIP, favoring tumor survival.

Resistance to Methotrexate

Intralesional methotrexate has been shown to be an effective adjuvant to surgery in the treatment of keratoacanthoma^{60,61} and SCC.⁶²

Methotrexate is a folic acid analog that binds to dihydrofolate reductase, inhibiting DNA synthesis and ultimately causing cell death. Keratoacanthoma is a fast-growing tumor

that frequently reaches a considerable size and can leave considerable functional and cosmetic defects when removed surgically. Annett et al.⁶³ reported a cure rate of 92% in a study of 38 patients with keratoacanthomas treated with a mean of 2.1 injections of methotrexate over an average of 18 days.

Growth rate can determine sensitivity or resistance to methotrexate in keratoacanthoma. Sensitivity, for instance, is high in the early stages of growth but is of little consequence at later stages, when growth is slower.⁶⁴

Although there are no standardized protocols for the use of methotrexate in the treatment of keratoacanthoma, drug concentration (generally 12.5–25 mg/mL) and/or frequency of injections (1–4 weekly) appear to be related to tumor response.⁶⁵

Key point: The growth rate of keratoacanthomas appears to influence response to treatment, with higher resistance rates seen in slow-growing tumors.

Resistance to Vismodegib

Vismodegib (GDC-0449) is an oral molecule that selectively inhibits the HH signaling pathway. It is the first drug available for the treatment of locally advanced and metastatic BCC.^{66,67}

Three HH signaling molecules have been described in vertebrates: Indian HH (expressed in the intestine and chondrocytes), Desert HH (expressed in Sertoli cells), and the better-known Sonic HH, which has been linked to many processes. The HH signaling pathway is composed of 3 basic elements: HH ligands, the inhibitory receptor Patched (PTCH), and the signaling receptor Smoothened (SMO).⁶⁸

The PTCH protein is the Sonic HH receptor and negatively regulates this pathway. The SMO protein, by contrast, positively regulates the pathway and is permanently activated in the absence of PTCH. SMO also activates Gli transcription factors, which penetrate the nucleus, activating the transcription of genes involved in cell growth, which, in turn control PTCH and Gli via a negative feedback mechanism. The result is activation of the pathway, with proliferation, apoptosis, and epidermal differentiation (Fig. 2). Proteolyzed Gli factors act as transcription inhibitors and their proteolysis depends on binding to microtubules and to suppressor of fused (Sufu) proteins that, when bound to Gli, prevent the activation of the target genes in the HH pathway.^{69–71}

UV radiation-induced mutations can be found in the HH pathway in sporadic BCC; 80% are caused by inactivation of PTCH1, 10% by SMO gain-of-function mutations, and just 1% by Sufu mutations.⁶⁸

Vismodegib binds to and specifically inactivates SMO, preventing the activation of Gli, and thereby halting cell proliferation and tumor growth. In a phase I clinical trial, Von Hoff et al.⁷² observed respective response rates of 60% and 50% for locally advanced and metastatic BCCs treated with vismodegib. Phase II studies have shown that a daily dose of vismodegib 150 mg produces a partial response rate of 30.3% in metastatic BCC and 22.2% in locally advanced BCC and a complete response rate of 20.6% in locally advanced BCC.⁷³

Resistance to treatment, however, has also been reported since the approval of vismodegib. The first case

corresponded to a patient with medulloblastoma due to a PTCH1 mutation (PTCH1-W844C) and mutations in other genes involved in the HH pathway, leading to rapid disease progression. Since then, there have been reports of isolated, mostly heterozygous, SMO mutations.^{74–76}

Brinkhuizen et al.⁷⁷ investigated acquired resistance to vismodegib, i.e., resistance related to mutations present in the resistant tumor but not in the primary, untreated, tumor. They found 2 SMO mutations: c.842G[T (p.Trp281Leu) in exon 4 and c.961G[A(p.Val321Met)] in exon 5.

Pricl et al.⁷⁸ studied primary and acquired resistance to vismodegib in 2 patients. The first patient had metastatic BCC in which disease progression (primary resistance) was confirmed by computed tomography 2 months after treatment with vismodegib 150 mg/d. The second patient had an unresectable large (12 cm) ulcerated locally advanced BCC in the supracapular region, also treated with vismodegib 150 mg/d. Although the treatment resulted in a complete clinical response at 5 months, the tumor returned 6 months later (acquired resistance). The authors detected a new mutation, SMO G497W, in the first case, and in the second case, they found a SMO D473Y mutation only in the biopsy sample of the pretreatment tumor. The first mutation gave rise to a conformational rearrangement of the protein that resulted in a partial obstruction of the drug entry site, while the second mutation induced a direct effect on binding site geometry, giving rise to complete disruption of hydrogen bond formation. The mutations may therefore reflect different mechanisms.

In a recent whole-exome sequencing study of BCC, Sharpe et al.⁷⁹ observed intratumoral heterogeneity, without mutations in the pretreatment biopsies, providing evidence that the mutations were all acquired and led to hyperactivation of the HH pathway. These mutations affected 2 regions of the SMO gene: the drug binding pocket and a distal location, suggesting possible cross-resistance. Copy number variations were also observed for Sufi and Gli2, but to a lesser extent.

Other mechanisms of resistance observed include mutations in the target HH gene cyclin D1 (CCND1)^{76,80} and compensatory upregulation of IGF-1R/PI3K as a possible pathway involved in the development of resistance to SMO inhibitors. This mechanism has been observed in LDE-225-resistant tumors.^{80,81}

Current research efforts are focused on new therapeutic targets and the development of second-generation inhibitors that remain active in the presence of mutations. Among the strategies being contemplated is inhibition of the HH pathway through itraconazole or arsenic oxide, which are both HH signaling pathway antagonists with a different mechanism of action to vismodegib.^{82,83}

An alternative approach might consist of blocking other pathways that interact with the HH signaling pathway in BCC and give rise to SMO-independent activation of Gli1, such as EGFR,⁸⁴ atypical protein kinase C α ,⁸⁵ protein kinase A,⁸⁶ and the RAS/MAPK and PI3K pathways.^{70,81,87}

Despite an initial favorable response, patients treated with SMO inhibitors develop resistance due to compensatory mechanisms generated over time. Furthermore, SMO inhibitors are not efficient in tumors where HH hyperactivation is due to mutations of components along the distal SMO pathway, or in the case of noncanonical

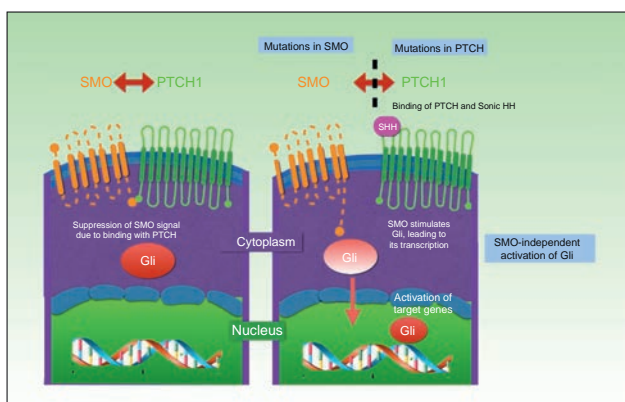


Figure 2 Diagram showing the mechanism of action of vismodegib and different mutations in the Hedgehog (HH) pathway that cause tumor resistance. SMO indicates smoothened; PTCH, patched.

activation, explaining why SMO-independent Gli transcription factors are activated. For all these reasons, intensive research efforts have been focused on HH inhibitors that act downstream of SMO,⁸⁸ such as GANT61, which blocks Gli function,⁸⁹ and on a new class of drugs targeting extra C-terminal (BET) bromodomain proteins and the bromodomain proteins BRD2-4 and BRDT, which recognize acetylated lysine residues such as histone N-terminal lysine residues, giving rise to a protein-histone association and subsequent chromatin remodeling. BRD4 regulates Gli transcription by acting on Gli1 and Gli2 promoters, evading all SMO resistance mechanisms described to date, including SMO and Sufu mutations and Gli2 amplifications.^{90,91}

Key point: Resistance to vismodegib is due to somatic mutations in PTCH and in SMO in particular, to mutations located distally to this transmembrane receptor, and to SMO-independent Gli activation and compensatory upregulation of IGF-1R/PI3 K.

Resistance to EGF Receptor Antibodies (Cetuximab)

The relatively recent approval of cetuximab, a monoclonal antibody that inhibits EGF receptor (EGFR) activity, has opened up new horizons for the systemic treatment of patients with unresectable or metastatic SCC. EGFR belongs to the ErbB receptor family, which has 4 members: ErbB1 (EGFR), ErbB2 (neu), ErbB3, and ErbB4.⁹²

Binding of a ligand to the extracellular domain of the receptor activates several intracellular signaling pathways, including the PI3 K/Akt pathway, the signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway, and the RAS-MAPK pathway, which are all involved in cell growth, proliferation, and/or survival (Fig. 3).⁹²⁻⁹⁴

Recognition of the important role played by EGFR in human tumor cell proliferation, survival, and progression

has led to the development of therapeutic targets, representing an important advance in oncology.⁹⁵⁻⁹⁹

Expression of EGFR has been correlated with worse prognosis in SCC of the head and neck and, also, although there are fewer studies available, in locally advanced, unresectable, and metastatic cutaneous SCC. In one phase II clinical trial of 36 patients, cetuximab produced 8 partial responses, 2 complete responses, and a disease control rate of 69% at 6 weeks, with a median progression-free survival of 4.1 months. EGFR overexpression was an inclusion criterion in the trial, which showed an association between treatment efficacy and EGFR tumor expression levels. The authors also studied other mutations and concluded that a lack of RAS mutations increased tumor sensitivity to cetuximab.¹⁰¹

Molecular mechanisms possibly involved in treatment resistance in colorectal cancer and SCC of the head and neck include K-RAS mutations and constitutive activation of EGFR and its distal pathway.¹⁰²⁻¹⁰⁵

Li et al.¹⁰⁶ described an association between acquired resistance to cetuximab and Src activity and EGFR-dependent nuclear translocation of Src. Other resistance mechanisms reported in the literature are PTEN instability, Akt hyperactivation,¹⁰⁷ increased expression of EGFR ligands,^{106,108} and positive regulation of EGFR, HER2, and HER3.¹⁰⁹⁻¹¹²

Key point: Mechanisms described for resistance to cetuximab include certain K-RAS mutations, constitutive EGFR activation, overexpression of nonmutated RAS, EGFR-dependent nuclear translocation of Src, PTEN instability, Akt hyperactivation, increased expression of EGFR ligands, and positive regulation of EGFR, HER2, and HER3.

Resistance to Radiotherapy

Radiotherapy uses ionizing radiation to shrink or kill tumors. The radiation can damage cells either directly or indirectly

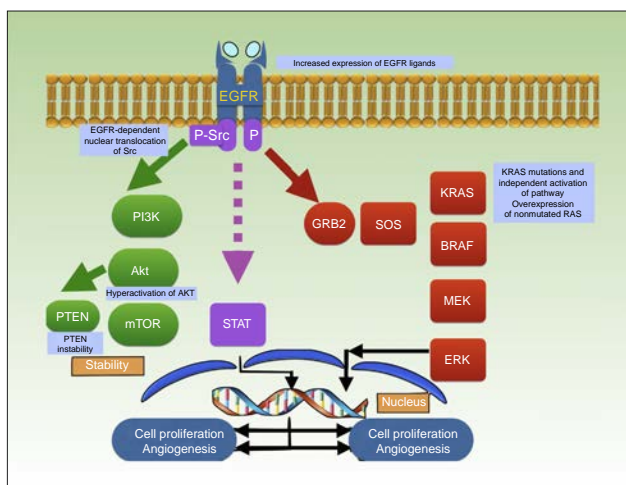


Figure 3 Mechanism of action of cetuximab, which blocks EGFR, preventing the activation of several intracellular signaling pathways, including PI3K/Akt, STAT, and RAS-MAPK. The graph shows the different mutations described to date in resistance to cetuximab in squamous cell carcinoma. EGFR indicates epidermal growth factor receptor; P, phosphorylation; P-Src, phosphorylated Src; STAT, signal transducer and activator of transcription.

through the production of ROS; DNA is the main target. There are 2 main types of ionizing radiation: photon radiation (x-rays and gamma rays), which is the most widely used, and particle radiation (electrons and protons, among others). In the first case, the effect are exerted through the production of free radicals, while in the second case, direct DNA damage is more important. Exposure to radiation can induce cell-cycle arrest, damage repair, or apoptosis, and in some cases it can promote cell division and generate resistance.^{113,114}

Radiotherapy is an effective first-line treatment for BCC and SCC, and it is associated with a 5-year cure rate of around 90%. It is also effective in skin cancers that have been surgically treated. It has been used for decades to treat NMSCs that have failed to respond to or were not suitable for other treatments. The adverse effects of ionizing radiation, however, are well-known and therefore the amount of radiation that can be applied is limited and recurrences may appear.^{115,116}

Most studies of radiotherapy in BCC have reported 5-year cure rates of over 90%, with very few complications. Radiotherapy can also be used in recurrent tumors, tumors with perineural invasion, and tumors with positive margins after SCC. It is also beneficial in certain anatomic locations, such as the lower eyelid, the lip, the tip of the nose, and the ear, where it is associated with an efficacy of between 70% and 95%. Recurrence rates are around 3% to 11%, although certain histologic differentiation grades and tumor sites are associated with higher rates.^{116–120}

Inhibition of EGFR and STAT3, which both have an important role in the transmission of growth signals initiated by EGFR, has been found to improve the effects of conventional

treatments, such as radiotherapy in SCC. Accordingly, the constitutive activation of these factors can also give rise to less radiosensitive, i.e., more resistant, tumors.¹²¹

Key point: Activation of EGFR and STAT3 affect the radiosensitivity of SCC cells.

Resistance to Chemotherapy

Various chemotherapy agents have been used in the treatment of SCC and advanced or unresectable BCC. In the first case, cisplatin has been used either alone or combined with other agents, and it has produced variable results. It has been mostly combined with bleomycin, doxorubicin, and 5-fluorouracil, and has also been used in combination with fluorouracil-based chemoradiation. However, its efficacy has not been demonstrated in randomized clinical trials and most of the data available are based on findings from small series. The most effective options for BCC appear to be cisplatin, used alone or in combination, and a regimen such as vincristine, bleomycin, and prednisolone. Nevertheless, with very few exceptions, long-term response rates have not been demonstrated for traditional chemotherapy, and it is therefore mainly used as a palliative treatment.¹²²

Conclusions

A wide variety of mechanisms have been described for resistance of NMSC to nonsurgical treatments. They include mechanisms related to intracellular drug transport (e.g., Ppg in PDT), mutations in target genes such as SMO with

vismodegib, alterations to molecular pathways such as MAPK in PDT and EGFR inhibitors and even intrinsic cell characteristics such as adhesion molecules, cytoskeleton components, size, and tumor progression. Analysis of primary and acquired resistance mechanisms will help to extend knowledge of the biology of different types of tumor and open new avenues for the investigation of new targets and alternative pathways to treat recurrences and overcome lack of response.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Bielsa I, Soria X, Esteve M, Ferrándiz C, Skin Cancer Study Group of Barcelonès Nord. Population-based incidence of basal cell carcinoma in a Spanish Mediterranean area. *Br J Dermatol*. 2009;161:1341–6.
- Tejera-Vaquero A, Descalzo-Gállego MA, Otero-Rivas MM, Posada-García C, Rodríguez-Pazos L, Pastushenko I, et al. Skin cancer incidence and mortality in Spain: a systematic review and meta-analysis. *Actas Dermosifiliogr*. 2016;107:318–28.
- Hallok GG, Lutz DA. A prospective study of the accuracy of the surgeon's diagnosis and significance of positive margins in non-melanoma skin cancers. *Plast Reconstr Surg*. 2001;107:942–7.
- Chren MM, Torres JS, Stuart SE, Bertenthal D, Labrador RJ, Boscardin WJ. Recurrence after treatment of non-melanoma skin cancer: A prospective cohort study. *Arch Dermatol*. 2011;147:540–6.
- Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA Cancer J Clin*. 2011;61:250–81.
- Allison RR, Moghissi K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. *Clin Endosc*. 2013;46:24–9.
- Milla Sanabria L, Rodríguez ME, Cogno IS, Rumie Vittar NB, Pansa MF, Lambert MJ, et al. Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1835:36–45.
- Panzarini E, Inguscio V, Dini L. Immunogenic cell death: Can it be exploited in photodynamic therapy for cancer? *Biomed Res Int*. 2013;2013:482160.
- Darłenski R, Fluhr JW. Photodynamic therapy in dermatology: Past, present, and future. *J Biomed Opt*. 2013;18:061208.
- Morton CA, Szeimies RM, Sidoroff A, Braathen LR. European guidelines for topical photodynamic therapy part 1: Treatment delivery and current indications-actinic keratoses, Bowen's disease, basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venerol*. 2013;27:536–44.
- Tschen EH, Wong DS, Pariser DM, Dunlap FE, Houlihan A, Ferdon MB. Photodynamic therapy using aminolevulinic acid for patients with nonhyperkeratotic actinic keratoses of the face and scalp: Phase IV multicentre clinical trial with 12-month follow up. *Br J Dermatol*. 2006;155:1262–9.
- Fernández-Guarino M, Harto A, Jaén P. Terapia fotodinámica: estudios con metilaminolevulinato en queratosis actínicas. *Actas Dermosifiliogr*. 2010;101:315–22.
- Rhodes LE, de Rie MA, Leifsdóttir R, Yu RC, Bachmann I, Goulden V. Five-year follow-up of a randomized, prospective trial of topical methyl aminolevulinic acid photodynamic therapy vs surgery for nodular basal cell carcinoma. *Arch Dermatol*. 2007;143:1131–6.
- Lopez N, Meyer-Gonzalez T, Herrera-Acosta E, Bosch R, Castillo R, Herrera E. Photodynamic therapy in the treatment of extensive Bowen's disease. *J Dermatolog Treat*. 2012;23:428–30.
- Dirschka T, Radny P, Dominicus R, Mensing H, Brünig H, Jenne L, et al. Long-term (6 and 12 months) follow-up of two prospective, randomized, controlled phase III trials of photodynamic therapy with BF-200 ALA and methylaminolevulinic acid for the treatment of actinic keratosis. *Br J Dermatol*. 2013;168:825–36.
- Lucena SR, Salazar N, Gracia-Cazaña T, Zamarrón A, González S, Juarraz A, et al. Combined treatments with photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer. *Int J Mol Sci*. 2015;16:25912–33.
- Wilkie R, Ibbotson S. Patient satisfaction in the photodynamic therapy clinic. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2015. <http://dx.doi.org/10.1111/phpp.12218> [Epub ahead of print].
- Rhodes LE, de Rie M, Enström Y, Groves R, Morken T, Goulden V, et al. Photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinic acid vs surgery for nodular basal cell carcinoma: Results of a multicenter randomized prospective trial. *Arch Dermatol*. 2004;140:17–23.
- Gilaberte Y, Milla L, Salazar N, Vera-Alvarez J, Kourani O, Damian A, et al. Cellular intrinsic factors involved in the resistance of squamous cell carcinoma to photodynamic therapy. *J Invest Dermatol*. 2014;134:2428–37.
- McKay KM, Sambrano BL, Fox PS, Bassett RL, Chon S, Prieto VG. Thickness of superficial basal cell carcinoma (sBCC) predicts imiquimod efficacy: A proposal for a thickness-based definition of sBCC. *Br J Dermatol*. 2013;169:549–54.
- Braathen LR, Szeimies RM, Basset-Seguin N, Bissonnette R, Foley P, Pariser D, et al. Guidelines on the use of photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer: An international consensus. *J Am Acad Dermatol*. 2007;56:125–43.
- Ramirez DP, Kurachi C, Inada NM, Moriyama LT, Salvo AG, Vollet Filho JD, et al. Experience and BCC subtypes as determinants of MAL-PDT response: Preliminary results of a national Brazilian project. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2014;11:22–6.
- Fantini F, Greco A, del Giovane C, Cesinaro AM, Venturini M, Zane C, et al. Photodynamic therapy for basal cell carcinoma: Clinical and pathological determinants of response. *J Eur Acad Dermatol Venerol*. 2011;25:896–901.
- Christensen E, Warloe T, Kroon S, Funk J, Helsing P, Soler AM, et al. Guidelines for practical use of MAL-PDT in non-melanoma skin cancer. *J Eur Acad Dermatol Venerol*. 2010;24:505–12.
- Madan V, West CA, Murphy JV, Lear JT. Sequential treatment of giant basal cell carcinomas. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2009;62:368–72.
- Fritsch C, Goerz G, Ruzicka T. Photodynamic therapy in dermatology. *Arch Dermatol*. 1998;134:207–14.
- Foley P, Freeman M, Menter A, Siller G, El-Azhary RA, Gebauer K, et al. Photodynamic therapy with methyl aminolevulinic acid for primary nodular basal cell carcinoma: results of two randomized studies. *Int J Dermatol*. 2009;48:1236–45.
- Szeimies RM, Ibbotson S, Murrell DF, Rubel D, Frambach Y, de Berker D, et al. A clinical study comparing methyl aminolevulinic acid photodynamic therapy and surgery in small superficial basal cell carcinoma (8–20 mm), with a 12-month follow-up. *J Eur Acad Dermatol Venerol*. 2008;22:1302–11.
- Vinciullo C, Elliott T, Francis D, Gebauer K, Spelman L, Nguyen R, et al. Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinic acid for 'difficult-to-treat' basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2005;152:765–72.
- Morton CA, Whitehurst C, McCol JH, Moore JV, MacKie RM. Photodynamic therapy for large or multiple patches of Bowen disease and basal cell carcinoma. *Arch Dermatol*. 2001;137:319–24.
- Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R, Capezzeria R, Parrinello G, Specchia C, et al. Methylaminolevulinic acid-based

- photodynamic therapy of Bowen's disease and squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2008;159:137–44.
32. Morton CA, Campbell S, Gupta G, Keohane S, Lear J, Zaki I, et al. Intraindividual, right–left comparison of topical methyl aminolevulinate–photodynamic therapy and cryotherapy in subjects with actinic keratoses: a multicentre, randomized controlled study. *Br J Dermatol*. 2006;155:1029–36.
 33. Kaufmann R, Spelman L, Weightman W, Reifemberger J, Szeimies R-M, Verhaeghe E, et al. Multicentre intraindividual randomized trial of topical methyl aminolevulinate–photodynamic therapy vs cryotherapy for multiple actinic keratoses on the extremities. *Br J Dermatol*. 2008;158:994–9.
 34. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: An evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2013;13:714–26.
 35. Al-Dimassi S, Abou-Antoun T, El-Sibai M. Cancer cell resistance mechanisms: A mini review. *Clin Transl Oncol*. 2014;16:511–6.
 36. Casas A, Di Venosa G, Hasan T, Battle AL. Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. *Curr Med Chem*. 2011;18:2486–515.
 37. Basset-Séguin N. What's new in dermato-oncology? *Ann Dermatol Venerol*. 2011;138 Suppl 4:S253–62.
 38. Bagazgoitia L, Cuevas Santos J, Juarranz A, Jaén P. Photodynamic therapy reduces the histological features of actinic damage and the expression of early oncogenic markers. *Br J Dermatol*. 2011;165:144–51.
 39. Yang SH, Andl T, Grachtchouk V, Wang A, Liu J, Syu LJ, et al. Pathological responses to oncogenic Hedgehog signaling in skin are dependent on canonical Wnt/ β -catenin signaling. *Nat Genet*. 2008;40:1130–5.
 40. Luna MC, Gomer CJ. Isolation and initial characterization of mouse tumor cells resistant to porphyrin-mediated photodynamic therapy. *Cancer Res*. 1991;51:4243–9.
 41. Rebutti M, Michiels C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochem Pharmacol*. 2013;85:1219–26.
 42. Trindade GS, Farias SL, Rumjanek VM, Capella MA. Methylene blue reverts multidrug resistance: Sensitivity of multidrug resistant cells to this dye and its photodynamic action. *Cancer Lett*. 2000;151:161–7.
 43. Tsai T, Hong RL, Tsai JC, Lou PJ, Ling IF, Chen CT. Effect of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on MCF-7 and MCF-7/ADR cells. *Lasers Surg Med*. 2004;34:62–72.
 44. Weyergang A, Berstad ME, Bull-Hansen B, Olsen CE, Selbo PK, Berg K. Photochemical activation of drugs for the treatment of therapy-resistant cancers. *Photochem Photobiol Sci*. 2015;14:1465–75.
 45. Müller-Decker K. Cyclooxygenase-dependent signaling is causally linked to non-melanoma skin carcinogenesis: Pharmacological, genetic, and clinical evidence. *Cancer Metastasis Rev*. 2011;30:343–61.
 46. Elmetts CA, Ledet JJ, Athar M. Cyclooxygenases: Mediators of UV-induced skin cancer and potential targets for prevention. *J Invest Dermatol*. 2014;134:2497–502.
 47. Del Vecchio CA, Feng Y, Sokol ES, Tillman EJ, Sanduja S, Reinhardt F, et al. De-differentiation confers multidrug resistance via noncanonical PERK-Nrf2 signaling. *PLoS Biol*. 2014;12:e1001945.
 48. Garg AD, Maes H, Romano E, Agostinis P. Autophagy, a major adaptation pathway shaping cancer cell death and anticancer immunity responses following photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci*. 2015;14:1410–24.
 49. Di Venosa G, Perotti C, Battle A, Casas A. The role of cytoskeleton and adhesion proteins in the resistance to photodynamic therapy. Possible therapeutic interventions. *Photochem Photobiol Sci*. 2015;14:1451–64.
 50. Girotti AW. Tumor-generated nitric oxide as an antagonist of photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci*. 2015;14:1425–32.
 51. Rapozzi V, Della Pietra E, Bonavida B. Dual roles of nitric oxide in the regulation of tumor cell response and resistance to photodynamic therapy. *Redox Biol*. 2015;6:311–7.
 52. Casas A, Perotti C, Ortel B, di Venosa G, Saccoliti M, Battle A, et al. Tumor cell lines resistant to ALA-mediated photodynamic therapy and possible tools to target surviving cells. *Int J Oncol*. 2006;29:397–405.
 53. Singh G, Espirito M, Shen XY, Hanlon JG, Rainbow AJ. In vitro induction of PDT resistance in HT29, HT1376 and SK-N-MC cells by various photosensitizers. *Photochem Photobiol*. 2001;73:651–6.
 54. Choi BH, Ryoo IG, Kang HC, Kwak MK. The sensitivity of cancer cells to pheophorbide a-based photodynamic therapy is enhanced by Nrf2 silencing. *PLoS One*. 2014;9:107158.
 55. Flechter S, Skarla A, Nievergelt H, Anex R, Borradori L, Parmentier L. Facial basal cell carcinomas recurring after photodynamic therapy: A retrospective analysis of histological subtypes. *Dermatology*. 2012;224:346–51.
 56. Bardazzi F, Loi C, Magnano M, Burtica EC, Giordano F, Patrizi A. Methyl-aminolevulinic acid photodynamic therapy for actinic keratoses: A useful treatment or a risk factor? A retrospective study. *J Dermatolog Treat*. 2015;26:168–70.
 57. Espada J, Galaz S, Sanz-Rodríguez F, Blázquez-Castro A, Stockert JC, Bagazgoitia L, et al. Oncogenic H-Ras and PI3 K signalling can inhibit E-cadherin-dependent apoptosis and promote cell survival after photodynamic therapy in mouse keratinocytes. *J Cell Physiol*. 2009;219:84–93.
 58. Milla LN, Cugno IS, Rodríguez ME, Sanz-Rodríguez F, Zamarrón A, Gilaberte Y, et al. Isolation and characterization of squamous carcinoma cells resistant to photodynamic therapy. *J Cell Biochem*. 2011;112:2266–78.
 59. Blázquez-Castro A, Carrasco E, Calvo MI, Jaén P, Stockert JC, Juarranz A, et al. Photoporphyrin IX-dependent photodynamic production of endogenous ROS stimulates cell proliferation. *Eur J Cell Biol*. 2012;91:216–23.
 60. Martorell-Calatayud A, Requena C, Nagore E, Sanmartín O, Serra-Guillén C, Botella-Estrada R, et al. Ensayo clínico: la infiltración intralesional con metotrexato de forma neoadyuvante en la cirugía del queratoacantoma permite obtener mejores resultados estéticos y funcionales. *Actas Dermosifiliogr*. 2011;102:605–15.
 61. Yoo MG, Kim IH. Intralesional methotrexate for the treatment of keratoacanthoma: Retrospective study and review of the Korean literature. *Ann Dermatol*. 2014;26:172–6.
 62. Salido-Vallejo R, Garnacho-Saucedo G, Sánchez-Arca M, Moreno-Giménez JC. Neoadjuvant intralesional methotrexate before surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the lower lip. *Dermatol Surg*. 2012;38:1849–50.
 63. Annett NM, VanBeek MJ, Arpey CJ, Whitaker DC. Intralesional methotrexate treatment for keratoacanthoma tumors: A retrospective study and review of the literature. *J Am Acad Dermatol*. 2007;56:989–93.
 64. Parker CM, Hanke CW. Large keratoacanthomas in difficult locations treated with intralesional 5-fluorouracil. *J Am Acad Dermatol*. 1986;14:770–7.
 65. Patel NP, Cervino AL. Treatment of keratoacanthoma: Is intralesional methotrexate an option? *Can J Plast Surg*. 2011;19:15–8.
 66. Cirrone F, Harris C. Vismodegib and the Hedgehog pathway: A new treatment for basal cell carcinoma. *Clin Ther*. 2012;34:2039–50.
 67. Robarge KD, Brunton SA, Castaneda GM, Cui Y, Dina MS, Goldsmith R, et al. GDC-0449-a potent inhibitor of the hedgehog pathway. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009;19:5576–81.

68. López Estebanz JL. Tratamiento del carcinoma basocelular invasivo o la vía del erizo. *Piel*. 2012;27:425–8.
69. Chuang PT, McMahon AP. Vertebrate Hedgehog signaling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature*. 1999;397:617–21.
70. Kogerman P, Grimm T, Kogerman L. Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nat Cell Biol*. 1999;1:312–9.
71. Ingham P, Placzek M. Orchestrating ontogenesis: Variations on a theme by sonic hedgehog. *Nat Rev Genet*. 2006;7:841–50.
72. Von Hoff DD, LoRusso PM, Rudin CM, Reddy JC, Yauch RL, Tibes R, et al. Inhibition of the Hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2009;361:1164–72.
73. Sekulic A, Migden M, Oro A, Dirix L, Lewis K, Hainsworth J, et al. Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2012;366:2171–9.
74. Rudin CM, Hann CL, Laterra J, Yauch RL, Callahan CA, Fu L, et al. Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med*. 2009;361:1173–8.
75. Yauch RL, Dijkgraaf GL, Alickie B, Januario T, Ahn CP, Hol-Comb T, et al. Smoothened mutation confers resistance to a hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. *Science*. 2009;326:572–4.
76. Dijkgraaf GL, Alickie B, Weinmann L, Januario T, West K, Modrusan Z, et al. Small molecule inhibition of GDC-0449 refractory smoothened mutants and downstream mechanisms of drug resistance. *Cancer Res*. 2011;71:435–44.
77. Brinkhuizen T, Reinders MG, van Geel M, Hendriksen AJ, Paulussen AD, Winnepenninckx VJ, et al. Acquired resistance to the Hedgehog pathway inhibitor vismodegib due to smoothened mutations in treatment of locally advanced basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2014;71:1005–8.
78. Pricl S, Cortelazzi B, Dal Col V, Marson D, Laurin E, Fermeigla M, et al. Smoothened (SMO) receptor mutations dictate resistance to vismodegib in basal cell carcinoma. *Mol Oncol*. 2015;9:389–97.
79. Sharpe HJ, Pau G, Dijkgraaf GJ, Basset-Seguin N, Modrusan Z, Januario T, et al. Genomic analysis of smoothened inhibitor resistance in basal cell carcinoma. *Cancer Cell*. 2015;27:327–41.
80. Ruiz Salas V, Alegre M, Garcés JR, Puig L. Locally advanced and metastatic basal cell carcinoma: Molecular pathways, treatment options and new targeted therapies. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2014;14:741–9.
81. Buonamici S, Williams J, Morrissey M. Interfering with resistance to smoothened antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. *Sci Transl Med*. 2010;2:51–70.
82. Kim J, Aftab BT, Tang JY, Kim D, Lee AH, Rezaee M, et al. Itraconazole and arsenic trioxide inhibit Hedgehog pathway activation and tumor growth associated with acquired resistance to smoothened antagonists. *Cancer Cell*. 2013;23:23–34.
83. Kim DJ, Kim J, Spaunhurst K, Montoya J, Khodosh R, Chandra K, et al. Open-label, exploratory phase II trial of oral itraconazole for the treatment of basal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2014;32:745–51.
84. Eberl M, Klingler S, Mangelberger D, Loipetzberger A, Damhofer H, Zoidl K, et al. Hedgehog-EGFR cooperation response genes determine the oncogenic phenotype of basal cell carcinoma and tumour-initiating pancreatic cancer cells. *EMBO Mol Med*. 2012;4:218–33.
85. Atwood SK, Li M, Lee A, Tang JY, Oro AE. Gli activation by atypical protein kinase C α regulates the growth of basal cell carcinomas. *Nature*. 2013;494:484–8.
86. Makinodan E, Marneros AG. Protein kinase A activation inhibits oncogenic sonic hedgehog signalling and suppresses basal cell carcinoma of the skin. *Exp Dermatol*. 2012;21:847–52.
87. Zhao X, Ponomarev T, Ornell KJ, Zhou P, Dabral SK, Pak E, et al. RAS/MAPK activation drives resistance to Smo inhibition, metastasis and tumor evolution in Shh pathway-dependent tumors. *Cancer Res*. 2015;75:3623–35.
88. Di Magno L, Coni S, di Marcotullio L, Canettieri G. Digging a hole under Hedgehog: Downstream inhibition as an emerging anticancer strategy. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1856:62–72.
89. Lauth M, Bergstrom A, Shimokawa T, Toftgard R. Inhibition of Gli-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:8455–60.
90. Tang Y, Gholamin S, Schubert S, Willardson MJ, Lee A, Bhandopadhyay P, et al. Epigenetic targeting of Hedgehog pathway transcriptional output through BET bromodomain inhibition. *Nat Med*. 2014;20:732–40.
91. Long J, Li B, Rodriguez-Blanco J, Pastori C, Volmar CH, Wahlestedt C, et al. The BET bromodomain inhibitor I-BET151 acts downstream of smoothened protein to abrogate the growth of hedgehog protein-driven cancers. *J Biol Chem*. 2014;289:35494–502.
92. Rodemann HP, Dittmann K, Toulany M. Radiation-induced EGFR-signaling and control of DNA-damage repair. *Int J Radiat Biol*. 2007;83:781–91.
93. Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH, et al. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res*. 2002;62:7350–6.
94. Barker FG 2nd, Simmons ML, Chang SM, Prados MD, Larson DA, Sneed PK, et al. EGFR overexpression and radiation response in glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001;51:410–8.
95. Barton J, Blackledge G, Wakeling A. Growth factors and their receptors: New targets for prostate cancer therapy. *Urology*. 2001;58:114–22.
96. Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy—focus on cetuximab. *Eur J Cancer*. 2001;37:16–22.
97. Kim ES, Khuri FR, Herbst RS. Epidermal growth factor receptor biology (IMCC225). *Curr Opin Oncol*. 2001;13:506–13.
98. Mendelsohn J, Baselga J. The EGFR receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene*. 2000;19:6550–65.
99. Gurtner K, Deuse Y, Butof R, Schaaf K, Eicheler W, Oertel R, et al. Diverse effects of combined radiotherapy and EGFR inhibition with antibodies or TK inhibitors on local tumour control and correlation with EGFR gene expression. *Radiother Oncol*. 2011;99:323–30.
100. Kasten-Pisula U, Saker J, Eicheler W, Krause M, Yaromina A, Meyer-Staeckling S, et al. Cellular and tumor radiosensitivity is correlated to epidermal growth factor receptor protein expression level in tumors without EGFR amplification. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011;80:1181–8.
101. Maubec E, Petrow P, Duvillard P, Laouenan C, Duval X, Lacroix L, et al. Cetuximab as first-line monotherapy in patients with skin unresectable squamous cell carcinoma: Final results of a phase II multicenter study (abstract). *J Clin Oncol*. 2010;28:8510.
102. Bardelli A, Siena S. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28:1254–61.
103. Wheeler DL, Dunn EF, Harari PM. Understanding resistance to EGFR inhibitors impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7:493–507.
104. Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiramam M, Liska D, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*. 2012;486:532–6.
105. Saki M, Toulany M, Rodemann HP. Acquired resistance to cetuximab is associated with the overexpression of Ras family members and the loss of radiosensitization in head and neck cancer cells. *Radiother Oncol*. 2013;108:473–8.

106. Li C, Iida M, Dunn EF, Ghia AJ, Wheeler DL. Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene*. 2009;28:3801–13.
107. Kim SM, Kim JS, Kim JH, Yun CO, Kim EM, Kim HK, et al. Acquired resistance to cetuximab is mediated by increased PTEN instability and leads cross-resistance to gefitinib in HCC827 NSCLC cells. *Cancer Lett*. 2010;296:150–9.
108. Hatakeyama H, Cheng H, Wirth P, Counsell A, Marcrom SR, Wood CB, et al. Regulation of heparin-binding EGF-like growth factor by miR-212 and acquired cetuximab-resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2010;5:e12702.
109. Wheeler DL, Huang S, Kruser TJ, Nechrebecki MM, Armstrong EA, Benavente S, et al. Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: Role of HER (ErbB) family members. *Oncogene*. 2008;27:3944–56.
110. Noordhuis MG, Eljssink JJ, Ten Hoor KA, Roossink F, Hollema H, Arts HJ, et al. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and activated EGFR predict poor response to (chemo) radiation and survival in cervical cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15:7389–97.
111. Yonesaka K, Zejnullahu K, Okamoto I, Satoh T, Cappuzzo F, Souglakos J, et al. Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Sci Transl Med*. 2011;3:99ra86.
112. Stegeman H, Kaanders JH, van der Kogel AJ, Iida M, Wheeler DL, Span PN, et al. Predictive value of hypoxia, proliferation and tyrosine kinase receptors for EGFR-inhibition and radiotherapy sensitivity in head and neck cancer models. *Radiother Oncol*. 2013;106:383–9.
113. Azzam EI, Jay-Gerin JP, Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett*. 2012;327:48–60.
114. Spitz DR, Azzam EI, Li JJ, Gius D. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: A unifying concept in stress response biology. *Cancer Metastasis Rev*. 2004;23:311–22.
115. Sidoroff A, Thaler P. Taking treatment decisions in non-melanoma skin cancer-the place for topical photodynamic therapy (PDT). *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2010;7:24–32.
116. Thom GA, Heywood JM, Cassidy B, Freund JM. Three-year retrospective review of superficial radiotherapy for skin conditions in a Perth radiotherapy unit. *Australas J Dermatol*. 2003;44:174–9.
117. Barysch MJ, Eggmann N, Beyeler M, Panizzon RG, Seifert B, Dummer R. Long-term recurrence rate of large and difficult to treat cutaneous squamous cell carcinomas after superficial radiotherapy. *Dermatology*. 2012;224:59–65.
118. Cho M, Gordon L, Rembielak A, Woo TC. Utility of radiotherapy for treatment of basal cell carcinoma: A review. *Br J Dermatol*. 2014;171:968–73.
119. Kallini JR, Hamed N, Khachemoune A. Squamous cell carcinoma of the skin: Epidemiology, classification, management, and novel trends. *Int J Dermatol*. 2015;54:130–40.
120. Lansbury L, Bath-Hextall F, Perkins W, Stanton W, Leonardi-Bee J. Interventions for non-metastatic squamous cell carcinoma of the skin: Systematic review and pooled analysis of observational studies. *BMJ*. 2013;347:f6153.
121. Bonner JA, Trummell HQ, Willey CD, Plants BA, Ralsch KP. Inhibition of STAT -3 results in radiosensitization of human squamous cell carcinoma. *Radiother Oncol*. 2009;92:339–44.
122. Soura E, Chasapi V, Stratigos AJ. Pharmacologic treatment options for advanced epithelial skin cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2015;16:1479–93.

DR. TAMARA GRACIA-CAZAÑA (Orcid ID : 0000-0002-0523-2076)

Article type : Letter to the Editor

Title **Methyl-aminolevulinate Photodynamic Therapy combined with curettage debulking for pigmented Basal Cell Carcinoma.**

Running head: **PDT for pigmented Basal Cell Carcinoma**

T. Gracia Cazaña ¹, S González ², A Juarranz ³, Y Gilaberte ⁴.

1. Dermatology Service. Hospital de Barbastro, Huesca. Spain.

2. Dermatology Service. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York. United States.

3. Biology Department. Universidad Autónoma de Madrid. Spain.

4. Dermatology Service. Hospital San Jorge, Huesca. Spain.

***Corresponding author:** Dr. Tamara Gracia-Cazaña. Department of Dermatology, Hospital de Barbastro, Huesca. Ctra Nacional 240 s/n – Barbastro, Huesca (Spain). E-mail: tamgracaz@gmail.com

Funding source: none

Conflict of interest: none declared

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1111/phpp.12313

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Keywords

1. Photodynamic Therapy
2. Pigmented Basal Cell Carcinoma
3. methyl 5-aminolevulinate

To the editor

Basal cell carcinoma (BCC) is the most common skin cancer, with an incidence rate in Spain of 113.05 cases per 100 000 person-years (CI95%, 89.03–137.08).¹ Pigmented BCCs (pBCCs), is a clinical and histological variant of BCC that exhibits increased pigmentation. pBCCs account for 6.7% to 8.5% of BCCs, and show a racial predilection.²⁻³

Photodynamic therapy (PDT) with methyl aminolevulinate cream (MAL) is indicated for superficial and nodular BCCs (sBCC and nBCC), but not for pBCCs, in which the pigment competes with Protoporphyrin IX (PpIX) for the absorption of the light, diminishing the photodynamic effect.⁴ Given the dearth of information in the literature, we sought to investigate the effectiveness of MAL-PDT with prior curettage debulking of pigment for the treatment of pBCC.

Patients and Methods

We conducted a retrospective study of pBCC patients treated with MAL-PDT in San Jorge Hospital, Huesca (Spain) between January 2006 and December 2015. Diagnosis was established clinically, assisted by dermoscopy, cytology, and histology if needed. Patients were treated with 16% MAL cream (Metvix®, Galderma, La Defense Cedex, France) for 3 hours under occlusion and irradiation with a red light-emitting diode (LED) lamp with a peak at 630 nm (37 J/cm²; Aktelite®; PhotoCure,

Oslo, Norway). In all pBCC immediately before the PDT session were subjected to curettage debulking, it was made until the macroscopic pigment was completely removed, in those whose pigment was deeper they required local anesthesia using mepivacaine at 2%. Clinical (sex, age of onset, immunosuppression, and tumour location and size) and procedural variables (number of PDT sessions, fluorescence diagnosis using Wood's lamp, analgesia prior to irradiation, pain evaluation using a visual analogue scale (0–10), local skin reactions, and cosmetic result) were evaluated, and their association with the treatment response was analysed. All data were analysed using SPSS, version 20.0 (SPSS, IBM Corp, Armonk, NY). Data were expressed as the mean \pm standard deviation or as a percentage. Comparisons between 2 groups were performed using the Mann-Whitney U-test for continuous variables or the Pearson chi-squared test for categorical variables, as appropriate. Binary logistic regression was used to calculate the odds ratio (OR) for qualitative variables with more than 2 categories. A 2-tailed p-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Two hundred eighty-five nodular BCC (nBCC), 119 superficial BCC (sBCC) and 25 pBCC were treated with MAL-PDT during the period of the investigation at San Jorge Hospital. The study population consisted of 25 patients with one lesion each. As 4 patients were lost to follow-up, a total of 21 lesions were analysed. The characteristics of the study population are summarized in Table 1a. Men comprised 57% of the study population and women 43%, and the mean (\pm SD) age was 73.05 ± 16.15 (range, 40–100 years). The average tumour size was 9.5 ± 8.48 mm, and the most frequent tumour locations were the scalp (23.8%) and chest (23.8%). The mean (\pm SD) duration of follow-up was 2.19 ± 2.89 years (range, 0.39–6.4 years). Sixteen patients showed a complete response to MAL-PDT (Fig.1), while 5 responded poorly, with 2 tumours showing no response at 3 months, 2 recurring at 6 months, and 2 recurring at 12 months (response rate, 76.19%; recurrence rate, 19.05%).

Analysis of procedure-related variables revealed that all patients received the same fluence per session (37 J/cm^2) without interruptions. Fluorescence was positive in 66.7% of cases. All patients received preventive oral analgesia 30 minutes before irradiation: 18 received acetaminophen (85.7%), 1 received metamizole (4.8%), and 2 (9.5%) received local anaesthesia without a vasoconstrictor. Most patients presented no adverse effects (95.2%). Among responders, 10 (62.5%) showed excellent cosmetic results, 3 (18.8%) presented with hypopigmentation, and 3 (18.8%) with hyperpigmentation.

Bivariate analysis (1b) revealed that the response to MAL-PDT was independent of age, sex, and both the size and location of the tumour ($p > 0.05$). The mean (\pm SD) level of pain perceived by non-responders (3.8 ± 1.79) was almost double that of responders (1.5 ± 1.15) ($p = 0.008$). No statistically significant association was found between pain score and tumour location (trunk 1.86 (SD 1.86) and head-neck 2.14 (SD 2.14), $p = 0.715$), histological depth ($r = -0.197$, $p = 0.803$) or clinical diameter ($r = -0.267$, $p = 0.406$).

Comparison of the response to MAL-PDT between different tumour types, also treated with dual-modality, curettage and MAL-PDT, revealed a higher overall response rate in sBCC patients (93.3%, $N = 111$) versus nBCC (76.8%, $N = 219$) or pBCC (76.2%) patients ($p < 0.001$), but no significant differences between nBCC and pBCC patients. The probability of responding to MAL-PDT was 4.687 (CI95%, 1.326–16.566) times higher for sBCC versus pBCC patients.

Discussion

Pigmented BCCs are well known to respond poorly to photodynamic therapy, as the presence of melanin in these tumours drastically reduces the optical penetration depth, diminishing the therapeutic effect.⁴ Based on our experience, MAL-PDT with prior curettage debulking is equally effective for the treatment of pBCC as for nodular BCC, for which it is indicated.

Few studies have investigated the effectiveness of MAL-PDT in pBCC. One such case series (N=18) examined the effect of MAL-PDT with intravenous photosensitizer administration (Photoheme), and reported an average response rate of 14% after a single session.⁴ Calzavara-Pinton et al.⁵ found that repetitive ALA-PDT efficacy was inversely related to tumour pigmentation and thickness, and was independent of histological subtype. However, in a recent case series of 16 pBCC patients,⁶ Ramírez and coworkers found that the efficacy of the technique was linked to histological subtype, with complete response rates of up to 50% for pBCCs vs 80.4% for sBCCs.

Clinical reports and case series have reported complete response rates of up to 87% for pBCC treated with PDT.⁷ These results are generally associated with with dual-modality approach including: debulking,⁸ electro-curettage with repeated PDT sessions,⁷ or the combination of PDT with systemic retinoid treatment (e.g., etretinate) to increase intracellular levels of PpIX in the tumour.⁹ In our series we observed no difference in PDT effectiveness in nBCCs versus pBCCs. It should be noted that our protocol includes careful curettage debulking in all BCC, the only difference in pBCC is that all macroscopically visible pigment is removed with it. This step may be the primary factor accounting for the good response rates observed.

Pain is the primary side effect of PDT, and a major limiting factor. PDT was generally well tolerated in our study. We include in our PDT-protocol the use of acetaminophen or metamizole 30 minutes before irradiation in most of our patients. Surprisingly Hambly et al.¹⁰ found that those patients who took analgesia 30 minutes prior to treatment had a significantly higher pain score than those who did not, this was because those who took analgesia were more likely to report higher pain scores; we were not able to found significant differences probably because the low size of our sample, however we have seen that it does not affect the response to MAL-PDT. We found that although the pain levels reported by the patients were not very high (median=2), those who reported greater pain obtained poorer results. The presence of pain is dependent on the size of the area treated, the innervation of the

irradiated area (higher in face, scalp, hands, and the perineal region), and the fluorescence of the lesion. A hypothesis would be that a less efficient debulking could be associated with more remaining tumoral cells, more PpIX accumulation, higher fluorescence and more pain; however, we found association neither between fluorescence and the response (table 2), nor between fluorescence and pain. Pain during irradiation sometimes entails interruption of the treatment process, which can cause patients to receive a suboptimal dose, reducing treatment effectiveness. No interruptions were recorded during irradiation of any of our patients. However, in our protocol we relieve pain using cool water or cool air, which may decrease PpIX photobleaching and consequently reduce treatment effectiveness.

Although the difference was not statistically significant, the mean age of non-responders was higher than that of responders, in agreement with previous findings demonstrating an age-associated decline in PpIX formation in human skin.

In our patients, one of the most frequent tumour locations was the chest. Surgical treatment of tumours in this region is associated with a high probability of aesthetic scarring. In our series, we observed a complete response and excellent cosmetic results for all tumours located on the chest, despite the mean longest diameter of 9.5 mm, which increases the probability of post-treatment scarring. Our findings thus indicate that PDT is a beneficial technique for the treatment of tumours in these locations, despite the presence of pigment.

We were not able to consider in our analysis whether the tumours were slightly or densely pigmented. However, we consider that removing as much pigment as possible by curettaging is important for the success of PDT.

To our knowledge, this is the longest published series of pBCC patients treated with PDT. Nonetheless, the study is limited by the small sample size, a result of the fact that pBCCs were treated with MAL-PDT only if the patient refused surgery and/or other topical treatments such as imiquimod failed. Furthermore, histological diagnosis was not established in all cases, and some pBCCs can have superficial or nodular histology, which can significantly influence the effectiveness of PDT.

In conclusion, we show that pBCCs have similar rates of response to MAL-PDT as nBCCs, provided that pigment is carefully removed from the tumour before treatment. We propose that MAL-PDT is a good alternative for large pBCCs, particularly those located in cosmetically sensitive locations, and for patients who do not wish to undergo surgery or are poor surgery candidates due to comorbidities.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Owen Howard for his English-language editing. This project received support from the National Institute of Health Carlos III and European Feder Fund, MINECO (FIS PI12/01253). The authors state no other conflicts.

REFERENCES:

1. Tejera-Vaquerizo A, Descalzo-Gallego MA, Otero-Rivas MM, et al. Skin Cancer Incidence and Mortality in Spain: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Actas Dermosifiliogr* 2016; 107: 318-28.
2. Betti R, Gualandri L, Cerri A, Inselvini E, Crosti C. Clinical features and histologic pattern analysis of pigmented basal cell carcinomas in an Italian population. *J Dermatol* 1998; 25: 691-4.
3. Morton CA, Szeimies RM, Sidoroff A, Braathen LR. European guidelines for topical photodynamic therapy part 1: treatment delivery and current indications - actinic keratoses, Bowen's

disease, basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013; 27: 536-44.

4. Kaviani A, Ataie-Fashtami L, Fateh M, et al. Photodynamic therapy of head and neck basal cell carcinoma according to different clinicopathologic features. *Lasers Surg Med* 2005; 36: 377-82.
5. Calzavara-Pinton PG. Repetitive photodynamic therapy with topical delta-aminolaevulinic acid as an appropriate approach to the routine treatment of superficial non-melanoma skin tumours. *J Photochem Photobiol B* 1995; 29: 53-7.
6. Ramirez DP, Kurachi C, Inada NM, et al. Experience and BCC subtypes as determinants of MAL-PDT response: preliminary results of a national Brazilian project. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2014; 11: 22-6.
7. Itoh Y, Henta T, Ninomiya Y, Tajima S, Ishibashi A. Repeated 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy following electro-curettage for pigmented basal cell carcinoma. *J Dermatol* 2000; 27: 10-5.
8. Pereyra-Rodriguez JJ, Bernabew-Wittel JJ, Gacto-Sanchez P, Conejo-Mir J. Pigmented basal cell carcinomas treated with photodynamic therapy. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2009; 75: 530-1.
9. Lin MH, Lee JY, Ou CY, Wong TW. Sequential systemic retinoid and photodynamic therapy for multiple keratotic pigmented nodular basal cell carcinomas on the scalp. *J Dermatol* 2009; 36: 518-21.
10. Hambly R, Mansoor N, Quinlan C, et al. Factors predicting pain and effect of oral analgesia in topical photodynamic therapy. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2017 Feb 14. doi: 10.1111/phpp.12301

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. **Pre-treatment** (A) Pigmented Basal Cell Carcinoma on the back, before MAL-PDT treatment.

(A-1) Superficial basal cell carcinoma with peripheral palisading and retraction artefacts and focal pigmentation within tumour. **After 3 months of treatment**

(B) Clinical aspect of the treated zone after the end of the treatment with MAL-PDT.

(B-1) Complete histological resolution after treatment with MAL-PDT.

Clinical and procedural variables		N (%) or Mean (SD)
Age	Mean (SD)	73.05 (16.15)
	Median	80
	Range	40–100
Sex	Male	12 (57.1%)
	Female	9 (42.9%)
Tumour location	Nose	1 (4.8%)
	Cheek	1 (4.8%)
	Forehead	2 (9.5%)
	Scalp	5 (23.8%)
	Ear	3 (14.3%)
	Neck	2 (9.5%)
	Back	2 (9.5%)
	Chest	5 (23.8%)
Largest diameter	Mean (SD)	9.5 (8.48)
	Median	8.5
	Range	3–35
Number of sessions	2	20 (95.2%)

	3	1 (4.8%)
Fluorescence	Positive	14 (66.7%)
	Negative	7 (33.3%)
Analgesia	Acetaminophen	18 (85.7%)
	Local anaesthesia	2 (9.5%)
	Metamizole	1 (4.8%)
Pain score (VAS 0–10)	Mean, (SD)	2.05 (1.62)
	Median	2
	Range	0–6
Interruption of irradiation	Yes	0 (0%)
	No	21 (100%)
Side effects	None	20 (95.2%)
	Oedema	1 (4.8%)
* Cosmetic results	Excellent	10 (47.6%)
	Hypopigmentation	3 (14.3%)
	Hyperpigmentation	3 (14.3%)
	Persistence/recurrence of tumour	5 (23.8%)
Complete response at 3 months	Yes	16 (76.2%)
	No	5 (23.8%)

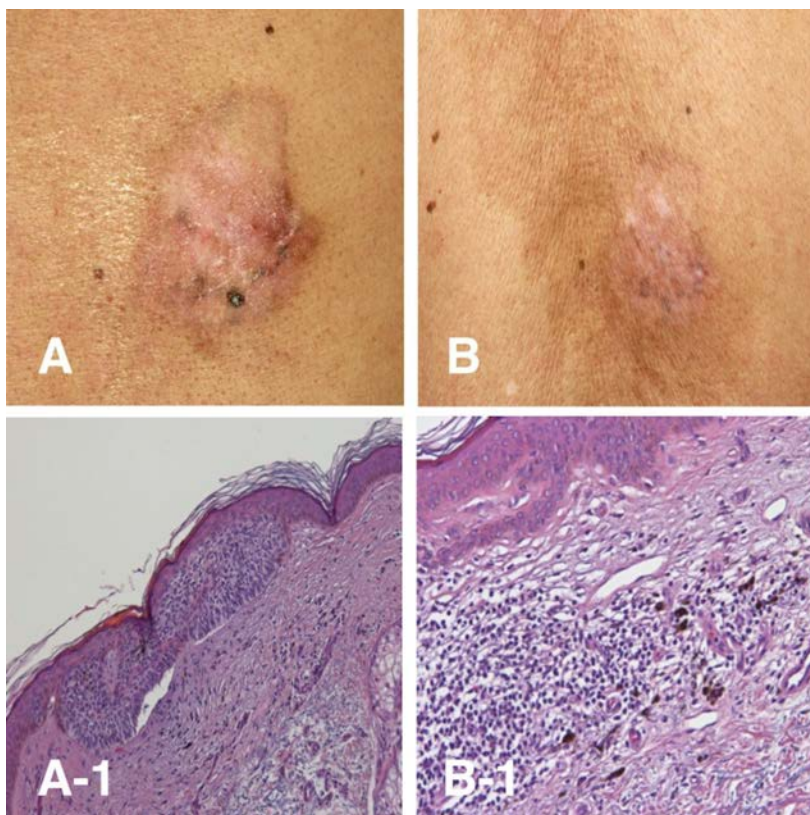
Recurrences	6 months	3 (14.3%)
	12 months	2 (9.5%)

Table 1a. Descriptive summary of the clinical and procedural characteristics that have been collected and studied of pigmented BCCs treated with MAL-PDT. * Cosmetic result was rated by the physician.

		Complete response to MAL-PDT N:16	No response or recurrence after MAL-PDT N=5	p-value
Age	(mean, SD)	70.56 (16.21)	83 (13.21)	0.319
Sex	Male	8 (66.7%)	4 (33.3%)	0.258
	Female	8 (88.9%)	1 (11.1%)	
Tumour location	Head and neck	10 (71.4%)	4 (28.6%)	0.642
	Trunk	6 (85.7%)	1 (14.3%)	
*Largest diameter	(mean, SD)	9.90 (8.76)	5	0.449
Number of sessions	2	16 (80%)	4 (20%)	0.238
	3	0 (0%)	1 (100%)	
Fluorescence	Yes	10 (71.4%)	4 (28.6%)	0.624
	No	6 (85.7%)	1 (14.3%)	

Analgesia	Acetaminophen	13 (72,2%)	5 (27.8%)	0.887
	Local anaesthesia	2 (100%)	0 (0%)	
	Metamizole	1 (100%)	0 (0%)	
Pain score	(mean, SD)	1.5 (1.15)	3.8 (1.79)	0.008

Table 1b. Summary of response rates based on different clinical and procedural variables of p BCCs based on response to MAL-PDT. * Largest diameter: only 5 cases.



SHORT COMMUNICATION

1

Photodynamic Therapy: Influence of Clinical and Procedure Variables on Treatment Response in Basal Cell Carcinoma and Bowen Disease

Tamara GRACIA-CAZAÑA¹, Marta MASCARAQUE², Nerea SALAZAR², Jesús VERA-ÁLVAREZ³, María PILAR FRÍAS⁴, Salvador GONZÁLEZ⁵, Ángeles JUARRANZ² and Yolanda GILABERTE⁴

¹Department of Dermatology, Hospital de Barbastro, Av Pirineos nº 11 1ºA, P.O. Box: 22011 – Barbastro, Huesca, ²Department of Biology, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, ³Department of Pathology, ⁴Department of Dermatology, Hospital San Jorge, Huesca, Spain, and ⁵Dermatology Service, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA. E-mail: tamgracaz@gmail.com
Accepted Jul 31, 2017; Epub ahead of print Aug 1, 2017

Photodynamic therapy (PDT) is one of the most commonly used non-invasive treatments in non-melanoma skin cancer (NMSC). High rates of complete remission can be obtained using PDT with methyl-aminolevulinic acid (MAL); for basal cell carcinoma (BCC) the response rate is 91% at 3 months and 76% at 5 years, with 5-year recurrence rates of 22% in superficial BCC (sBCC) and 14% in nodular BCC (nBCC) (1, 2), and for Bowen disease (BD) the rate ranges from 88% to 100% at 3 months with 68% to 89% of treated lesions remaining clear for 17 to 50 months, besides PDT provides excellent cosmetic results and a high patient satisfaction rate (1–3).

The primary limiting factors for MAL-PDT are pain during irradiation, tumoural thickness, tumour location (reduced sustained clearance rates for H-zone lesions), and certain histological features of BCCs such as pigmented, morpheiform, and infiltrative variants are considered contra-indications to treatment (3). Although the PDT procedure has changed little since its introduction, we conducted a retrospective analysis to evaluate how individual procedural variables relating to PDT influence the clinical response of BCC and BD.

MATERIALS AND METHODS

This retrospective observational study analysed clinical and procedural variables for all cases of BD, nBCC and sBCC treated with MAL-PDT at San Jorge Hospital (Huesca, Spain) between January 2006 and December 2015.

Patients were treated with MAL-PDT (Metvix®, Galderma, La Defense Cedex, France) following the standard procedure (3). Patients with nBCC first underwent curettage debulking of the lesions. After applying haemostatic pressure, MAL was applied to the lesion and a surrounding area of 1 cm in diameter, and was incubated for 3 h under occlusion. The treated area was illuminated with a coherent monochromatic diode light source (630 nm, 37 J/cm², AktiLite®, PhotoCure ASA, Norway).

The clinical records of all patients were reviewed and data gathered for the following variables: age at onset, sex, phototype (Fitzpatrick scale I–IV), predisposing factors, location, size and type of tumour. The following procedural variables were considered: number of PDT sessions; fluorescence emitted by the lesion in response to a Wood's lamp; interruption of illumination due to pain; analgesia prior to irradiation and pain score as evaluated using a visual analogue scale (0–10). Clinical response was evaluated at the end of patient follow-up.

Statistical analyses were performed using the statistical package SPSS, version 19.0 (IBM, Armonk, NY, USA). Associations between qualitative variables were assessed using the Pearson chi-squared test or Fisher exact test. The normal distribution of

quantitative variables was evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test. Depending on the data distribution, associations between binary and quantitative variables were evaluated using either the Student's *t*-test or Mann-Whitney *U*-test. In cases of variables with more than two categories, the ANOVA or the Kruskal-Wallis tests were used. Analyses of the odds ratio (OR) of a good response to PDT were performed using logistic regression. *p*-values < 0.05 were considered statistically significant.

The study protocol was approved by the Ethical Committee for Clinical Research of Aragon, Spain (CP-CI PI12/0096).

RESULTS

The study population consisted of 472 tumours in 249 patients, with a mean ± standard deviation (SD) age of 71.7 ± 13.78 years. Of these, 59% were men and 41% women. The majority (92.6%) had no relevant medical history, only 6.6% had received prior radiotherapy, and the remainder had received transplants. The mean ± SD age of treatment responders (69.98 ± 14.27 years) was lower than that of non-responders (74.45 ± 11.1 years) (*p* < 0.01).

The majority of the lesions analysed were nBCCs (60.4%), followed by sBCCs (25.2%), and BD lesions (14.4%). The back was the most common tumour location (19.3%) followed by the forehead (16.1%); it was associated with treatment response, with a poorer response observed for lesions located on the face. Of non-responding patients, 70% had lesions located on the face (*p* < 0.01). In the statistical analysis when we divided the lesions according to the facial anatomical area affected, we verified that of the total of 71 lesions that were located in the nose, only 63.4%, demonstrating that the nasal localization was an independent predictor of poor response (*p* = 0.01).

A complete clinical response was observed for 81.1% of patients, the mean ± SD follow-up time was 35.96 ± 23.46 months. The number of PDT sessions administered was as follows: 1 session, 11.7% of tumours; 2 sessions, 85.6% of tumours; 3 sessions, 2.6% of tumours.

Bivariate analysis revealed a statistically significant association between clinical response and the following variables: age (69.98 ± 4.27 years in responders vs 74.46 ± 11.07 years in non-responders; *p* = 0.01); location, with best response rate (92%) observed for lesions located on the trunk, and the worst response rate (75.62%) observed for those located on the head and

neck ($p < 0.001$); and lesion type, with response rates of 76.8% for nBCC, 93.3% for sBCC, and 77.9% for BD ($p = 0.02$). Phototype data were only available for 20% of patients, the most common phototype was type 3 (63.35%) higher cure rates were associated with lighter versus darker phototypes (85.7% vs 57.9%; $p = 0.031$).

The mean pain score was 2.44 ± 2.03 , and was lower in responders (2.2 ± 1.85) than in non-responders (3.02 ± 2.43) ($p = 0.01$). The majority of patients received preventive oral analgesia 30 min before illumination (acetaminophen or metamizole). In the responder group 76% of patients received oral analgesia, 9.5% received local anaesthesia, and the remainder (14.5%) required no analgesia. In the non-responder group, 74.7% received oral analgesia and 17.6% received local anaesthesia. Application of local anaesthesia was significantly associated with a poorer response ($p = 0.03$). Table S1¹ shows the bivariate analysis of all the study parameters.

All variables for which the bivariate analysis revealed a significant association with treatment response were included in the multivariate analysis, except for phototype, for which data was missing for a significant number of patients. The highest OR (95% confidence interval (CI)) for complete clinical response was observed for sBCC; 2.8 (1.29–6.21). A poorer response was significantly associated with the following variables: a pain score higher than the median (2) (OR, 0.545; 95% CI, 0.332–0.895); local anaesthesia (OR, 0.479; 95% CI, 0.244–0.943); and lesion location on the nose (OR, 0.411; 95% CI, 0.230–0.734) (Nagelkerke R^2 0.117).

DISCUSSION

Our findings indicate a greater probability of complete response to PDT for sBCC than for nBCC or BD. The presence of significant pain during irradiation and the use of local anaesthesia appear to decrease the likelihood of complete response. Furthermore, our results indicate that PDT should not be used in tumours located on the nose, and treatment efficacy may be diminished in patients with a dark phototype.

The effectiveness of PDT may be limited by other clinical and epidemiologic factors, including age. We found that the mean age of treatment responders was significantly lower than that of non-responders. Supporting this observation, Nissen and coworkers found that PDT was more effective in younger patients, and described an age-associated decrease in the formation of PpIX (4). Other authors have found no evidence of such an association (5, 6).

We found that the location of the NMSC was a key determinant of treatment effectiveness. Supporting these findings, Fantini et al. (7) reported better response rates

for trunk lesions versus those on the head/neck or limbs. Similarly, Vinciullo et al. (8) found significantly lower CR rates for lesions located on the face/scalp compared with those located on the trunk/neck. Nonetheless, other studies have found that lesion location was not a determinant of the response to MAL-PDT (8–10).

Regarding tumour type, our results are in agreement with the fact that BD and sBCC responded better to PDT compared to nBCC, these differential response rates were due to differences in the tumour thickness, which is a significant limiting factor in PDT (7, 11).

Spraying cold water is our preferred method to relieve pain during irradiation. It has been recently reported that warming the skin may increase the effectiveness of ALA-PDT (12). It remains to be determined whether the use of cold to alleviate pain during irradiation impairs the effectiveness of PDT. Oral analgesia or local anaesthesia are frequently used to improve tolerance and adherence to PDT (13) but is permitted only in the absence of vasoconstrictors in order to preserve an adequate flow of oxygen to the lesion during treatment. However, we report here for the first time that local, but not troncular, anaesthesia may diminish the PDT response. The explanation for this effect may be that all local anaesthetics have pH values > 7.4 , and ALA and its precursor MAL are unstable in neutral or basic pH media or an inadequate light penetration of the tissue is another mechanism that may account for the reduced effectiveness of PDT.

The main limitation of our study is its retrospective design, which implies variable durations of follow-up.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Owen Howard for his English-language editing. This project received support from the National Institute of Health Carlos III and European Feder Fund, MINECO (FIS PI12/01253).

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Rhodes LE, de Rie MA, Leifsdottir R, Yu RC, Bachmann I, Goulden V, et al. Five-year follow-up of a randomized, prospective trial of topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy vs surgery for nodular basal cell carcinoma. *Arch Dermatol* 2007; 143: 1131–1136.
2. Basset-Seguín N, Ibbotson SH, Emtestam L, Tarstedt M, Morton C, Maroti M, et al. Topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy versus cryotherapy for superficial basal cell carcinoma: a 5 year randomized trial. *Eur J Dermatol* 2008; 18: 547–553.
3. Morton C, Szeimies RM, Sidoroff A, Wennberg AM, Basset-Seguín N, Calzavara-Pinton P, et al. European Dermatology Forum Guidelines on topical photodynamic therapy. *Eur J Dermatol* 2015; 25: 296–311.
4. Nissen CV, Philipsen PA, Wulf HC. Protoporphyrin IX formation after topical application of methyl aminolevulinate and BF-200 ALA declines with age. *Br J Dermatol* 2015; 173: 760–766.
5. Cabete J, Rafael M, Cravo M, Moura C, Sachse F, Pecegueiro M. Long-term recurrence of nonmelanoma skin cancer after topical methylaminolevulinate photodynamic therapy in a dermatology department. *An Bras Dermatol* 2015;

¹<https://www.medicaljournals.se/acta/content/abstract/10.2340/00015555-2756>

- 90: 846–850.
6. Christensen E, Mørk C, Skogvoll E. High and sustained efficacy after two sessions of topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for basal cell carcinoma: a prospective, clinical and histological 10-year follow-up study. *Br J Dermatol* 2012; 166: 1342–1348.
 7. Fantini F, Greco A, Del Giovane C, Cesinaro AM, Venturini M, Zane C, et al. Photodynamic therapy for basal cell carcinoma: clinical and pathological determinants of response. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25: 896–901.
 8. Vinciullo C, Elliott T, Francis D, Gebauer K, Spelman L, Nguyen R, et al. Photodynamic therapy with topical methyl aminolaevulinate for 'difficult-to-treat' basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2005; 152: 765–772.
 9. Szeimies RM, Ibbotson S, Murrell DF, Rubel D, Frambach Y, de Berker D, et al. A clinical study comparing methyl aminolevulinic acid photodynamic therapy and surgery in small superficial basal cell carcinoma (8–20 mm), with a 12-month follow-up. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008; 22: 1302–1311.
 10. Morton CA, Whitehurst C, McColl JH, Moore JV, MacKie RM. Photodynamic therapy for large or multiple patches of Bowen disease and basal cell carcinoma. *Arch Dermatol* 2001; 137: 319–324.
 11. Ramirez DP, Kurachi C, Inada NM, Moriyama LT, Salvio AG, Vollet Filho JD, et al. Experience and BCC subtypes as determinants of MAL-PDT response: preliminary results of a national Brazilian project. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2014; 11: 22–26.
 12. Willey A, Anderson RR, Sakamoto FH. Temperature-modulated photodynamic therapy for the treatment of actinic keratosis on the extremities: a one-year follow-up study. *Dermatol Surg* 2015; 41: 1290–1295.
 13. Serra-Guillen C, Hueso L, Nagore E, Vila M, Llombart B, Requena Caballero C, et al. Comparative study between cold air analgesia and supraorbital and supratrochlear nerve block for the management of pain during photodynamic therapy for actinic keratoses of the frontotemporal zone. *Br J Dermatol* 2009; 161: 353–356.

Supplementary material to article by T. Gracia-Cazaña et al. "Photodynamic Therapy: Influence of Clinical and Procedure Variables on Treatment Response in Basal Cell Carcinoma and Bowen Disease"

Table S1. Summary of epidemiological, clinical and procedural variables that affect final outcome of methyl-aminolevulinate-photodynamic therapy (MAL-PDT)

Clinical and procedural variables	Responders n (%) [mean ± SD]	Non-responders n (%) [mean ± SD]	p-value
Age, years	383 [69.98 ± 14.27]	89 [74.46 ± 11.07]	0.01
Sex			
Male	225 (80.6)	54 (19.4)	0.739
Female	158 (81.9)	35 (18.1)	
Tumour size, mm	202 [11.07 ± 8.08]	57 [12.42 ± 8.14]	0.27
Phototype			
I-II	12 (85.7)	2 (14.3)	0.025
III	49 (86)	8 (14)	
IV	11 (57.9)	8 (42.1)	
Predisposing factors			
None	351 (80.3)	86 (19.7)	0.042
Transplant	0 (0)	3 (100)	
Radiotherapy	31 (100)	0 (0)	
Immunosuppressants	1 (100)	0 (0)	
Type of tumour			
nBCC	219 (76.8)	23.2 (8)	0.02
sBCC	111 (93.3)	66 (6.7)	
Bowen disease	53 (77.9)	15 (22.1)	
Location			
Head and neck	214 (75.62)	69 (24.38)	<0.01
Trunk	116 (92.06)	10 (7.94)	
Extremities	53 (84.1)	10 (15.9)	
Fluorescence			
Intense or mild	361 (82.4)	77 (17.6)	0.278
Negative	15 (75)	5 (25)	
Treatment interruption			
Yes	6 (54.5)	5 (45.5)	0.039
No	376 (81.7)	84 (18.3)	
Pain	380 [2.2 ± 1.85]	87 [3.06 ± 2.43]	0.02
Analgesia			
Systemic analgesics	282 (82.9)	58 (17.1)	0.049
Local anaesthesia	35 (68.6)	16 (31.4)	
None	61 (82.4)	13 (17.6)	
Number of sessions			
1	44 (88)	6 (12)	0.02
2	323 (80.15)	80 (19.85)	
≥ 3	10 (52.6)	9 (47.4)	



Clinical, histological, and immunohistochemical markers of resistance to Methyl-aminolevulinate Photodynamic therapy in Bowen's disease.

Journal:	<i>British Journal of Dermatology</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Gracia-Cazaña, Tamara; Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa", Dermatology Salazar, Nerea; Universidad Autonoma de Madrid, Biology Vera-Álvarez, Jesús; Hospital General San Jorge, Pathology Aquilera, Jose; University of MALAGA, MEDICINE AND DERMATOLOGY. FACULTY OF MEDICINE; Lopez Navarro, Norberto; University Clinic Hospital , Dermatology; Herrera, Enrique; Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Dermatology Gonzalez, Salvador; Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Dermatology Juarraz, Angeles; Universidad Autonoma de Madrid, Biology Gilaberte, Yolanda; Hospital General San Jorge, Dermatology
Keywords:	Basal Cell Carcinoma, p53, Therapeutics, Photodynamic Therapy

Clinical, histological, and immunohistochemical markers of resistance to Methylaminolevulinate Photodynamic therapy in Bowen's disease.

*Tamara Gracia-Cazaña ¹, *Nerea Salazar ², Jesús Vera-Álvarez ³, José Aguilera ⁴, Norberto López-Navarro ⁴, Enrique Herrera-Ceballos ⁴, Salvador González ⁵, *Ángeles Juarranz ², Yolanda Gilaberte ⁶.

1. Department of Dermatology. Hospital de Barbastro. Huesca, Spain.
2. Departament of Biology. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, Spain.
3. Department of Pathology. Hospital San Jorge. Huesca, Spain.
4. Department of Dermatology. Hospital Virgen de la Victoria. Málaga, Spain.
5. Dermatology Service, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA.
6. Department of Dermatology. Hospital San Jorge. Huesca, Spain.

* These authors have contributed equally in the elaboration of the manuscript.

*Corresponding author: Dr. T. Gracia-Cazaña. Departament of Dermatology. Hospital de Barbastro. Huesca, Spain. Ctra Nacional s/n , Huesca, Spain. P.O.Box: 22300. Telephone: (+34) 657571403. E-mail: tamgracaz@gmail.com

This project received support from the Instituto de Salud Carlos III and Fondos Feder Europeos, MINECO (FIS PI12/01253). The authors state no other conflicts.

All persons designated as authors had participated in the work to take public responsibility in its contents.

Short title: **Markers of resistance to Photodynamic therapy in Bowen's disease.**

What's already known about this topic?

-Common mechanisms, involving extrinsic and cellular factors, may underlie resistance to PDT as well as other antitumoral therapies.

-Extrinsic factors include those pertaining to tumor vasculature and stroma; intracellular alterations also may contribute to poor treatment responses to PDT.

-Mechanisms implicated in PDT resistance include differences in the incorporation and expulsion of drugs; alterations in intracellular traffic; loss of drug activity; increases in drug inactivation; and the mutation of genes.

What does this study add?

- p53, cyclin D1 and EGFR are emerging as possible biomarkers to select those patients who will benefit of receiving MAL-PDT for this tumor.

- The expression of p53 and a high mitotic index are markers of good response.

- The expression of EGFR, and cyclin D1 could be a potential marker of poor response.

Keywords:

1. Basal Cell Carcinoma
2. p53
3. Therapeutics
4. Photodynamic Therapy

Abbreviations:

1. MAL-PDT: Methyl-aminolevulinate photodynamic therapy.
2. BD: Bowen's disease.
3. SCC: Squamous cell carcinoma.
4. HPV: Human papillomavirus.
5. NMSC: Non-melanoma skin cancer.
6. SD: Standard deviation.
7. CI: Confidence interval.
8. EGFR: Epidermal growth factor receptor.

9. AK: Actinic keratosis.

10. PpIX: Protoporphyrin IX

11. hpf: high-power field.

12. RFI: Relative fluorescence intensity.

For Peer Review

Abstract

While methyl-aminolevulinate photodynamic therapy (MAL-PDT) is an effective treatment option for Bowen's disease (BD), resistance is observed in some cases. Here, we sought to identify biomarkers of MAL-PDT response in BD. We conducted a retrospective (2006–2015) observational analysis of clinical, histological, and immunohistochemical variables (p53, Ki-67, cyclin D1, COX-2, E-cadherin, and EGFR expression) in BD patients treated with MAL-PDT in 2 Spanish university hospitals.

The PDT response rate in the 33 study participants was 67.7% after 6 years of follow-up. Immunohistochemistry revealed p53 immunopositivity in 90.5% of responders and 30% of non-responders ($p=0.01$; OR=11.25, CI95% 11.07–114.46), and cyclin D1 positivity in 33.3% of responders and 80% of non-responders ($p=0.023$). EGFR expression intensity was mild-to-moderate in 85.7% of responders, and intense in 60% of non-responders ($p=0.015$). The response to MAL-PDT was also evaluated *in vitro* in 2 cell lines (SCC-13 and A-431) with distinct proliferation rates, mitotic indices, and levels of p53 expression. SCC-13 cells were more resistant to MAL-PDT than A-431 cells ($p<0.01$), and had a lower proliferation rate, mitotic index, and levels of p53 expression as determined by Western blot and immunofluorescence ($p<0.01$). Our findings suggest that p53, cyclin D1, and EGFR may constitute useful biomarkers for the selection of BD patients who may benefit from MAL-PDT.

Introduction

Bowen's disease (BD), first described by John Bowen, is an *in situ*, intraepidermic squamous cell carcinoma (SCC), which principally appears on photoexposed areas.¹ Although it tends to remain *in situ* for long periods of time,

between 3% and 5% of cases evolve to an invasive SCC.¹⁻² The etiology of BD appears to be multifactorial, involving both exogenous (environmental) and endogenous factors. Two key exogenous factors are sun exposure and human papillomavirus (HPV). Specifically, HPV serotype 16 has been implicated in the pathogenesis of BD.³ In this regard the evolution of BD is similar to that of vulvar intraepithelial neoplasia (VIN), in which HPV is also implicated.^{3,4}

Methyl-aminolevulinate (MAL) photodynamic therapy (PDT) is an excellent option for the treatment of BD (strength of recommendation, A; quality of evidence, 1).⁵ Clearance rates at 3 months after 1 or 2 cycles of MAL-PDT range from 86% to 93%, decreasing to 68% to 71% after 2 years of follow-up.⁶⁻⁷ However, despite good response rates, some tumors prove non-responsive due to primary or acquired resistance.⁸⁻⁹

Resistance to therapy contributes to tumor progression and is associated with a worse prognosis. While the phenomenon of treatment resistance to chemotherapy and radiotherapy has been well-studied,¹⁰⁻¹² PDT resistance has received less research attention.¹³⁻¹⁵ Common mechanisms, involving extrinsic and cellular factors, may underlie resistance to PDT as well as other antitumoral therapies. Extrinsic factors include those pertaining to tumor vasculature and stroma.¹⁵ On the other hand, intracellular alterations also may contribute to poor treatment responses to PDT.¹³ Mechanisms implicated in PDT resistance include differences in the incorporation and expulsion rates of drugs; alterations in intracellular traffic; loss of drug activity; increases in drug inactivation; and in particular the mutation and/or activation of certain genes.¹⁶ Genetic factors include those implicated in the genesis of non-melanoma skin cancer (NMSC) as well as genes activated or altered following treatment.

The present study sought to identify clinical, histological, and molecular variables implicated in the response to MAL-PDT in BD. To this end, we conducted

analyses using skin samples from BD patients as well as 2 representative cell lines; the SCC-13 cell line, obtained from a moderate cutaneous SCC,¹⁷ and the A431 cell line, derived from a vulvar epidermoid carcinoma (European Collection of Cell Cultures).

MATERIALS AND METHODS

Patients

Design

This retrospective observational study included all patients histologically diagnosed with BD and treated with 2 cycles of MAL-PDT between January 2006 and December 2015 at the Dermatology Services of *San Jorge* Hospital (Huesca, Spain) and Hospital *Virgen de la Victoria* (Málaga, Spain). The histological samples were stored in the archives of the hospital's Pathology Services. The inclusion criteria were as follows: histological diagnosis of BD, with a clinical follow-up period of >3 months, and available clinical and pathological records.

Ethical concerns

The present study was strictly observational, and involved no change to the regular care regimen of participating patients. The study protocol was approved by the Aragón Ethical Committee for Clinical Research (CP-CI PI12/0096) and is part of a FIS investigation project (exp PI12/01253).

MAL-PDT treatment

Patients were treated using PDT with methyl aminolevulinate cream (MAL, 160 mg/g of Metvix; Galderma, Sophia Antipolis, France) following the standard procedure.⁵ Prior to treatment, curettage of the lesion was performed to eliminate hyperkeratosis. In all cases, the cream was applied and incubated for 3 hours under occlusion, followed by exposure to 37 J/cm² (8 minutes) of illumination with a coherent, monochromatic red light source with a diode system (630 nm, Aktilite lamp;

PhotoCure ASA, Oslo, Norway). Protoporphyrin IX (PpIX) fluorescence was routinely assessed before and after treatment.

Clinical variables

The following clinical variables were included in our analysis: age at diagnosis, sex, and tumor size and location.

Histological variables

Hematoxylin-eosin-stained sections were examined using an Olympus BX61 microscope (Olympus, Center Valley, PA, USA) coupled to a DP50 CCD digital camera (Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan). Images were processed using Adobe Photoshop CS5 Extended (Version 12, Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA).

The following variables were evaluated: epidermal thickness (mm); histological subtype (psoriasiform/atrophic/acantholytic/epidermolytic); presence or absence of elastosis, inflammatory infiltrate, and superficial ulceration; and number of mitoses per high-power field (hpf).

Immunohistochemical variables

The expression of biological markers implicated in mechanisms of PDT resistance, based on previous findings by our group, was also examined.¹³ To this end, we used rabbit monoclonal antibodies against phospho-Erk1/2 (1/50; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), cyclin D1 (prediluted; Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA), EGFR (prediluted; Ventana Medical Systems), survivin (1/400; Abcam, Cambridge, MA, USA), Ki-67 (prediluted; Ventana Medical Systems), and COX-2 (prediluted; Cell Marque Corporation, Rocklin, CA, USA), and mouse monoclonal antibodies against E-cadherin (prediluted; Ventana Medical Systems) and p53 (prediluted; Ventana Medical Systems).

Sections derived from human skin biopsies were subjected to automated immunostaining (TechMate 500, BioTech Solutions, Dako, Glostrup, Denmark) and then incubated with a detection kit (Chemate, code K4001, Dako) according to manufacturer's recommendations. Color development was achieved using 3-amino-9-ethylcarbazole solution (Dako) as a chromogen. Heat-induced epitope retrieval was performed using a pressure cooker. Representative sections were examined using positive and negative controls.¹³

Immunohistochemical evaluation of p53 and Ki-67 was performed by identifying the area of the tumor with the highest levels of immunoexpression ("hot spots") and estimating the percentage of cells with nuclear positivity in a high-power field (400×). Expression of cyclin D1, EGFR, survivin, E-cadherin, pERK, and COX-2 was semiquantitatively assessed by classifying expression intensity into 4 categories: 0, absence of staining; 1, mild staining (0–33% tumoral cell staining); 2, moderate staining (>33–66%); and 3, intense staining (>66–100% tumoral cell staining). Staining patterns for pERK and survivin were defined as focal or diffuse, and survivin staining was classified as predominantly nuclear or cytoplasmatic. All samples were simultaneously evaluated by 2 pathologists blind to the study samples.

Cell culture

Experiments were performed using the SCC-13 line, derived from a moderate SCC located on the face,¹⁷ and the A431 vulvar epidermoid carcinoma cell line (European Collection of Cell Cultures). Cells resistant to MAL-PDT were obtained as previously described¹⁸ by exposing parental SCC-13 and A-431 cells to several cycles of MAL-PDT. The final population received a total of 10 treatment cycles (from the 1st [P] to the 10th [10G] resistant generation). Briefly, cells were exposed to 1 mM MAL for 4 hours and thereafter subjected to red light (0, 1, or 2.25 J/cm²). Resistance was assessed using

the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with high glucose supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin, and 5% L-glutamine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO₂). Cultures at 60–75% confluency were used for all experiments.

Immunofluorescence assays

Cells were seeded on glass coverslips (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) and fixed with 3.7% formaldehyde (Panreac, Barcelona, Spain) and then permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS before incubation with specific mouse-anti-p53 (Cell Signaling Technology®, Danvers, MA, USA) and mouse-anti- α -tubulin (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) primary antibodies. Subsequently, coverslips were incubated with specific anti-IgG secondary antibody Alexa fluor® 488 goat anti-mouse IgG (Life technologies TM, Carlsbad, CA, USA), and mounted on slides using ProLong® Gold Antifade Mountant-DAPI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). Microscopic images were obtained by using an epifluorescence microscope coupled to a DP70 CCD camera (Olympus BX-61) with excitation filters (UG-1, 360–370 nm; or BP 490, 450–490 nm).

Expression of p53 was determined by analysis of microscopy images, by quantifying mean fluorescence per nucleus using ImageJ software. Relative fluorescence intensity (RFI) represents the mean fluorescence per cell line. The mitotic index (ratio of the number of cells undergoing mitosis to the number of cells not undergoing mitosis) of each cell line was calculated by analysis of α -tubulin/DAPI microscopy images.

Western blot analysis

Cells were lysed in buffer (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% deoxycholate, 0.1% SDS, 10 mM Tris-HCl pH 7.2, 5 mM EDTA, phosphatase and protease inhibitor cocktail) (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA). Proteins were electrophoresed, blotted on PVDF membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and incubated overnight at 4°C with the primary mouse anti-p53 (Cell Signaling Technology®). Next, membranes were incubated with peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse secondary antibody (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and bands visualized by chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) using the high-definition ChemiDoc XRS[®] system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Bands corresponding to the proteins were digitalized and quantified using Image Lab, version 3.0.1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Clonogenic assay

The clonogenic assay was performed as previously described.¹⁸ Briefly, cells were seeded at appropriate dilutions (25 and 50 cells/ml) to form colonies within 12 days. Colonies (defined as a population of at least 50 cells) were stained with crystal violet (0.2% w/v), counted, and classified by size (small, 1–2 mm; large: > 2 mm).

Statistical analysis

Continuous variables were described as the mean and standard deviation (SD) and dichotomous variables as proportions. Associations between qualitative variables were assessed using Pearson's Chi-squared test or Fisher's exact test. Given the small sample size, the Mann-Whitney U-test or Kruskal-Wallis test for paired data were used to evaluate associations between quantitative variables. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Variables that showed a significant association with the response to PDT were included in a multivariate analysis performed using logistic regression. Analyses

were performed using SPSS Statistics software for Windows (Version 19.0: IBM Corp, Armonk, NY).

RESULTS

From a total of 65 patients treated for BD with MAL-PDT, only 33 had undergone previous biopsies; 24 from San Jorge Hospital and 9 from Virgen de la Victoria Hospital. A response to MAL-PDT was observed for 27 (79.4%) patients after 3 months of follow-up, decreasing to 23 (67.7%) after 6 years of follow-up.

Clinical variables

Table 1 summarizes the clinical variables results. The mean age of study participants was 75.76 years (SD=11.21); 73.5% (n=24) were male and 26.5% (n=9) female. The mean (\pm SD) tumoral size was 16.45 ± 8.38 mm, and was larger in non-responders (25 ± 8.66 mm) versus responders (14.94 ± 7.6 mm) ($p=0.052$). Lesion distribution was as follows: 55.9% of lesions were located on the head and neck, 26.5% on the limbs; and 17.6% on the trunk. Lesion location was not associated with MAL-PDT response ($p=0.226$).

Histological variables

Of the total 33 cases included in the study, samples required to perform all histological and immunohistological analyses were available for 21 responders and 10 non-responders. Furthermore, for 9 of the 10 patients in the latter group, histology was performed after treatment, which involved surgical removal of the tumor.

Histological variables are summarized in Table 1. In both groups, the psoriasiform variant was the most frequent type (66.7% of responders and 80% of non-responders). The mean number of mitoses per field was 2.3 ± 2.97 among responders and 1.3 ± 1.87 among non-responders ($p=0.329$). Evaluation of the presence of elastosis and inflammatory infiltrate revealed higher MAL-PDT response rates in those with

elastosis versus those without (76.2% vs 50%), and in those with peritumoral inflammatory infiltrate versus those without (70.8% vs 57.1%).

Immunohistochemical variables

Positive p53 immunostaining was observed in 90.5% of responders, but only 30% of non-responders ($p=0.01$) (Fig. 1). The mean percentage of p53-positive cells was 53.16 (SD=32.6) among responders and 26.75 (SD=41.08) among non-responders ($p=0.173$). Cyclin D1 immunostaining was detected in 33.3% of responders versus 80% of non-responders ($p=0.023$). The immunostaining of EGFR was intense in 14.3% of responders and in 60% of non-responders ($p=0.015$) (Fig. 1).

In the multivariate analysis, p53 was the only variable significantly associated with the response to PDT; patients with positive p53 immunostaining were 11.25 times more likely to achieve cure than p53-negative patients (CI95% 11.07–114.46). Immunohistochemical results are summarized in Table 2. Immunohistochemical variables statistically associated with the response to PDT are shown in Figure 2.

MAL-PDT non-responders: histological variables before and after treatment

Two of the 9 non-responder tumors showed histology compatible with invasive SCC after MAL-PDT (6.0% of all samples) (Table 2). Immunohistochemistry revealed an increase in p53 expression after PDT, from 26.75 (SD 41.08) before treatment to 52.52 (SD=46.70) after (Table 2). A similar effect was observed for survivin (6 cases [66.6%]) showed negative or mild immunostaining before MAL-PDT and the same proportion showed moderate or intense immunostaining after treatment).

Cell culture: MAL-PDT response and biomarker expression

Figures 3-4 show the response to MAL-PDT, in terms of proliferation capacity, mitotic index, and p53 expression in the 2 squamous cell carcinoma cell lines. Sensitivity to MAL-PDT was greater in A-431 vs SCC-13 cells ($p<0.01$) (Fig. 3A).

Western blot analysis revealed higher levels of p53 expression before treatment in A-431 versus SCC-13 cells. In addition, we observed an increase in p53 expression in PDT-resistant vs parental cells, as also observed in patients. These finding were also confirmed by quantifying fluorescence intensity in p53 immunofluorescence experiments in both cell lines and in the corresponding MAL-PDT-resistant cell populations ($p < 0.01$) (Fig. 3B).

Regarding the proliferative capacity of the cultured cells, the mean (\pm SD) mitotic index of A-431 cells was higher (4.92 ± 1.09) than that of SCC-13 cells (2.82 ± 0.2) cells. MAL-PDT-resistant SCC-13 cells had a higher mitotic index than corresponding parental cells, an effect not observed for MAL-PDT-resistant A-431 cells (Fig. 4A). Clonogenic assays revealed larger and more numerous colonies in parental A-431 than parental SCC-13 cells. A similar effect was observed for MAL-PDT-resistant SCC-13 cells compared with corresponding parental cells. By contrast, MAL-PDT-resistant A-431 cells formed more numerous but smaller colonies as compared with parental A-431 cells ($p < 0.05$) (Fig. 4B).

DISCUSSION

While the use of PDT as an anticancer therapy is well described, tumor cells do not always respond to the oxidative stress and immune response generated by PDT, and thus survive treatment. This resistance or lack of sensitivity to therapy contributes to tumoral progression and a worse prognosis.⁸⁻⁹

Our results suggest that larger tumor size and a higher mitosis count in BD may be associated with a better response to MAL-PDT. In our series, p53 expression was a marker of good response, and was the only variable significantly associated with a positive outcome in the multivariate analysis. Moreover, intense expression of cyclin D1 and EGFR appear to be markers of a poor MAL-PDT response.

Histology revealed the presence of inflammatory infiltrate in 76% of responders and 50% non-responders. We previously reported that the absence of peritumoral inflammatory infiltrate is associated with a poor MAL-PDT response in invasive SCC patients.¹³ Ruiter et al.¹⁹ define the tumoral microenvironment as a structural constellation between normal and tumoral cells, in which the inflammatory infiltrate plays a key role in tumor progression. As such, the presence of inflammatory infiltrate could be considered a native antitumoral response and, in agreement with our previous findings,²⁰ may exert an adjuvant effect on PDT. Similarly, a higher response rate was observed in BD patients with elastosis than in those without. Evidence suggests that PDT reduces the accumulation of dystrophic elastotic material in the dermis.²¹ However, to our knowledge, ours is the first study to assess the effect of solar elastosis on PDT response. Further studies will be necessary to confirm this finding.

Mutations in p53 have been detected in 76.09% of BD cases,²² and in up to 90% of invasive SCC cases.²³ A significant relationship between p53 immunostaining and PDT response rates has been described; in our series 90.5% of *in situ* SCCs were p53-positive, a considerably higher rate than the 76.09% reported in the current literature.²² By contrast, only 30% of non-responders had p53-positive tumors, suggesting that p53 positivity is a marker of better PDT response in BD patients. Studies of the role of p53 mutations in PDT response have produced conflicting findings. While some have reported that MAL-PDT markedly reduces the percentage of p53-mutated cell clones versus non-p53-mutated cell clones,²²⁻²⁶ effective MAL-PDT has also been associated with a reduction in p53 expression.²¹ In our series both immunohistochemistry and Western blot revealed increases in mean levels of p53 expression in non-responder patients and cells, suggesting that in these patients PDT may favor the evolution of BD to more aggressive carcinomas. However, in our study population only 2 resistant cases

developed invasive SCC after treatment; for the other 7 treatment-resistant patients histological findings compatible with BD were observed both before and after PDT.

Another possible factor involved in the PDT response is cyclin D1, a component of the Wnt/ β -catenin pathway implicated in the progression of AK to SCC. Cyclin D1 is a cell cycle regulatory protein, increases in cyclin D1 levels result in a shortening of the G1 phase of the cell cycle, stimulating malignant transformation.²⁷ In the case of cutaneous SCC, high levels of cyclin D1 expression are associated with more aggressive tumors and worse prognosis. In a recent study of 17 SCC cases, cyclin D1 positivity was observed in 70.8% of patients and 43.3% of BD patients, and no differences were observed between distinct histologic grades of differentiation.⁹ In our series, cyclin D1 positivity was clearly observed in 80% of non-responders. By contrast, responders showed negative or mild cyclin D1 expression. These findings are in agreement with previously studies proposing that cyclin D1 may serve as a marker of poor PDT response.^{13, 28}

We found that the likelihood of achieving cure with PDT in BD patients was higher in patients with mild-to-moderate versus intense EGFR immunostaining. High levels of EGFR expression have been associated with a worse prognosis and more aggressive tumors, and in some cases with resistance to certain cytotoxic agents used in cancer treatment.^{13,29} Accordingly, higher EGFR expression before PDT may be a determinant of a poor response and may even increase tumor metastatic potential.¹³

Survivin expression increased after MAL-PDT, in line with our previous findings in SCC-13 cells, in which survivin expression increased in MAL-PDT-resistant versus parental cells.¹⁸ MAL-PDT-induced activation of survivin in SCC cells may thus act as a mechanism of treatment resistance.

Our findings in patients were supported by the results obtained in cell culture. The 2 SCC cell lines used in the study, SCC-13 and A-431, the former derived from the face and the latter from the vulva, are good models in which to assess the predictive value of biomarkers of the PDT response identified in patient biopsies. While these 2 cell lines differ in terms of p53 expression, mitotic index, and proliferation, we observed a clear correlation between the responses to PDT in each cell line. A poorer response was observed in SCC-13 cells, which displayed a lower mitotic index and reduced P53 expression and proliferative capacity compared with A-431 cells.

Limitations of the present study include the small number of patients for whom tumor histology data was available. However, our findings point to cyclin D1, P53, and EGFR as possible biomarkers for the selection of patients who could benefit from MAL-PDT for this tumor type. While MAL-PDT did not appear to increase the clinical aggressiveness of tumors in non-responder patients, the possibility of post-treatment evolution to invasive SCC should be considered.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Owen Howard for his English-language editing. This project received support from the Instituto de Salud Carlos III and Fondos Feder Europeos, MINECO (FIS PI12/01253). The authors state no other conflicts.

REFERENCES

1. Reizner GT, Chuang TY, Elpern DJ, et al. Bowen's disease (squamous cell carcinoma in situ) in Kauai, Hawaii. A population-based incidence report. *J Am Acad Dermatol* 1994;**31**:596-600.

2. Hansen J, Drake A, Walling H. Bowen's Disease: A Four-Year Retrospective Review of Epidemiology and Treatment at a University Center. *Dermatol Surg* 2008;**34**:878-83.
3. Zheng S, Adachi A, Shimizu M, et al. Human papillomaviruses of the mucosal type are present in some cases of extragenital Bowen's disease. *Br J Dermatol* 2005;**152**:1243-7.
4. Skapa P, Zamecnik J, Hamsikova E, et al. Human papillomavirus (HPV) profiles of vulvar lesions: possible implications for the efficacy of prophylactic HPV vaccination. *Am Surg Pathol* 2007;**31**: 1834-43.
5. Morton CA, Birnie AJ, Eedy DJ. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of squamous cell carcinoma in situ (Bowen's disease) 2014. *Br J Dermatol* 2014;**170**:245-60.
6. Morton CA, Horn M, Leman J, et al. Comparison of topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy with cryotherapy or Fluorouracil for treatment of squamous cell carcinoma in situ: Results of a multicenter randomized trial. *Arch Dermatol* 2006; **142**:729-35.
7. Calzavara-Pinton P, Venturini M, Sala R. Methylaminolaevulinate-based photodynamic therapy of Bowen's disease and squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2008;**159**: 137-44.
8. Gracia-Cazaña T, González S, Gilaberte Y. Resistance of Non-melanoma Skin Cancer to Nonsurgical Treatments. Part I: Topical Treatments. *Actas Dermosifiliogr* 2016;**107**:730-39.
9. Gracia-Cazaña T, Salazar N, Zamarrón A, et al. Resistance of Nonmelanoma Skin Cancer to Nonsurgical Treatments. Part II: Photodynamic Therapy, Vismodegib, Cetuximab, Intralesional Methotrexate, and Radiotherapy. *Actas*

- Dermosifiliogr* 2016;**107**:740-50.
10. Ratour-Bigot C, Chemidling M, Montlahuc C, et al. Squamous Cell Carcinoma Following Photodynamic Therapy for Cutaneous Bowen's Disease in a Series of 105 Patients. *Acta Derm Venereol* 2016; **96**:658-63.
11. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 2013;**13**:714-26.
12. Al-Dimassi S, AbouNAntoun T, El-Sibai M. Cancer cell resistance mechanisms: a mini review. *Clin Transl Oncol* 2014;**16**:511-6.
13. Gilaberte Y, Milla L, Salazar N, et al. Cellular intrinsic factors involved in the resistance of squamous cell carcinoma to photodynamic therapy. *J Invest Dermatol* 2014 ;**134**:2428-37.
14. Bardazzi F, Loi C, Magnano M, et al. Methyl-aminolevulinic acid photodynamic therapy for actinic keratoses: a useful treatment or a risk factor? A retrospective study. *J Dermatolog Treat* 2015;**26**:168-70.
15. Fiechter S, Skaria A, Nievergelt H, et al. Facial basal cell carcinomas recurring after photodynamic therapy: a retrospective analysis of histological subtypes. *Dermatology* 2012;**224**:346-51.
16. Casas A, Di Venosa G, Hasan T, et al. Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. *Curr Med Chem* 2011;**18**:2486-515.
17. Rheinwald JG, Beckett MA. Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultured from human squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 1981;**41**:1657-63.
18. Milla LN, Cogno IS, Rodríguez ME, et al. Isolation and characterization of squamous carcinoma cells resistant to photodynamic therapy. *J Cell Biochem* 2011;**112**:2266-78

- 1
2
3 19. Ruiter D, Bogenrieder T, Elder D, et al. Melanoma stroma interactions:
4 structural and functional aspects. *Lancet Oncol* 2002;**3**:35-43.
5
6
7
8 20. Talmadge JE. Immune cell infiltration of primary and metastatic lesions:
9 mechanisms and clinical impact. *Semin Cancer Biol* 2011;**21**:131-8.
10
11 21. Bagazgoitia L, Cuevas Santos J, Juarranz A, et al. Photodynamic therapy
12 reduces the histological features of actinic damage and the expression of early
13 oncogenic markers. *Br J Dermatol* 2011;**165**:144-51.
14
15
16 22. Sakiz D, Turkmenoglu TT, Kabukcuoglu F. The expression of p63 and p53 in
17 keratoacanthoma and intraepidermal and invasive neoplasms of the skin. *Pathol*
18 *Res Pract* 2009;**205**:589-94.
19
20
21 23. Stratigos AJ, Kapranos N, Petrakou E, et al. Immunophenotypic analysis of the
22 p53 gene in non-melanoma skin cancer and correlation with apoptosis and cell
23 proliferation. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005;**19**:180-6.
24
25
26 24. Riesenberger R, Fuchs C, Kriegmair M. Photodynamic effects of 5-aminolevulinic
27 acid-induced porphyrin on human bladder carcinoma. *Eur J Cancer*
28 1996;**32A**:328-34.
29
30
31 25. Gallegos ER, De León Rodríguez I, Martínez Guzmán LA, et al. In vitro study
32 of biosynthesis of protoporphyrin IX induced by delta-aminolevulinic acid in
33 normal and cancerous cells of the human cervix. *Arch Med Res* 1999;**30**:163-70.
34
35
36 26. Krieg RC, Fickweiler S, Wolfbeis OS, et al. Cell-type specific protoporphyrin
37 IX metabolism in human bladder cancer in vitro. *Photochem Photobiol*
38 2000;**72**:226-33.
39
40
41 27. Hui AM, Li X, Shi YZ, et al. Cyclin D1 overexpression is a critical event in
42 gallbladder carcinogenesis and independently predicts decreased survival for
43 patients with gallbladder carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;**6**:4272-7.
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 28. Shen Y, Xu J, Jin J, et al. Cyclin D1 expression in Bowen's disease and
4
5 cutaneous squamous cell carcinoma. *Mol Clin Oncol* 2014;**2**:545-8.
6
7
8 29. Brabender J, Danenberg KD, Metzger R, et al. Epidermal growth factor receptor
9
10 and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer is correlated
11
12 with survival. *Clin Cancer Res* 2001;**7**:1850-5.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

	Responders N (%)	Non-responders N (%)	p value
Clinical Characteristics			
	N=23	N=10	
Age (years; mean ± SD)	75.78 ± 10.67	70.40 ± 12.67	0.749
Sex (N, %)			0.686
Male	16 (66.7%)	8 (33.3%)	
Female	7 (77.8%)	2 (22.2%)	
Tumor size	(14.94 ± 7.60 mm)	(25.00 ± 8.66 mm)	0.052
Location			0.226
Head	12 (66.7%)	6 (33.3%)	
Extremities	8 (88.9%)	1 (11.1%)	
Trunk	3 (50.0%)	3 (50.0%)	
Histological Characteristics			N=21
N=10	(N,%)		
(N,%)			
Variants			0.657
Atrophic	6 (75%)	2 (25%)	
Psoriasiform	14 (63.6%%)	8 (36.4%)	
Acantholytic	1 (100%)	0 (0%)	
Elastosis			0.145
Yes	16 (76.2%)	5 (23.8%)	
No	5 (50%)	5 (50%)	
Inflammation			0.652
Yes	17 (70.8%)	7 (29.2%)	
No	4 (57.1%)	3 (42.9%)	
Tumoral thickness (mean, SD)	0.52 ± 0.34	0.43 ± 1.85	0.358
Mitoses (mean, SD)	2.3 ± 2.97	1.3 ± 1.87)	0.329
Immunohistochemical Variables			
	N=21	N=10	
P53			0.01
Positive	19 (86.4%)	3 (13.6%)	
Negative	2 (22.2%)	7 (77.8%)	
Cyclin D1			0.023
Moderate-to-intense	7 (46.7%)	8 (53.3%)	
Mild or negative	14 (87.5%)	2 (12.5%)	
EGFR			0.015
Intense	3 (33.3%)	6 (66.7%)	
Mild-to-moderate	18 (81.8%)	4 (18.2%)	
COX-2			0.530

Moderate-to-intense	4 (100%)	0 (0%)	
Mild or negative	10 (66.7%)	5 (33.3%)	
Unknown	7	5	
Ki-67			0.576
Positive	21 (67.7%)	10 (32.3%)	
Negative	0 (0%)	0 (0%)	
Mean (SD)	54.47 ± 28.3	48.5 ± 25.6	
Survivin			0.121
Moderate-to-intense	14 (82.4%)	3 (17.6%)	
Mild	3 (42.9%)	4 (57.1%)	
Negative	2 (50%)	2 (50%)	
Unknown	2	1	
p-ERK			0.230
Intense to moderate	6 (100%)	0 (0%)	
Mild	6 (75%)	2 (25%)	
Negative	7 (53.8%)	6 (46.2%)	
Unknown	2	1	
E-cadherin			
Positive	17 (77.3%)	5 (22.7%)	
Negative	0 (0%)	0 (0%)	
Unknown	4	5	

Table 1. Summary of clinical, histological, and immunohistochemical variables in

Bowen's disease patients and association with response to PDT. Unknown indicates cases for which less than satisfactory immunohistochemistry results were obtained.

	BEFORE-PDT (N, %)	AFTER-PDT (N, %)
Histological Characteristics	N=9	N=9
Histological type		
Atrophic	2 (22.2%)	1 (11.1%)
Psoriariform	7 (77.8%)	6 (66.6%)
Invasive SCC	0 (0%)	2 (22.2%)
Solar elastosis		
Present	5 (55.5%)	5 (55.5%)
Absent	4 (44.4%)	4 (44.4%)
Inflammation		
Present	6 (66.6%)	7 (77.8%)
Absent	3 (33.3%)	2 (22.2%)
Number of mitoses (Mean ± SD)	2.44 ± 3.12	2.73 ± 2.01
Tumoral thickness (Mean ± SD)	0.44 ± 0.19	0.95 ± 0.70
Immunohistochemical Variables	N=9	N=9
P53 (%)	26.75 ± 41.08	52.25 ± 46.70
(Mean ± SD)		
Ki-67	49.67 ± 26.87	53.78 ± 26.86
(Mean ± SD)		
E-cadherin		
Moderate-Intense	4 (44.4%)	3 (33.3%)
Mild	0 (0%)	1 (11.1%)
Unknown	5 (55.5%)	5 (55.5%)
COX-2		
Positive	0 (0%)	1 (11.1%)
Mild positive	3 (33.3%)	2 (22.2%)
Negative	1 (11.1%)	1 (11.1%)
Unknown	5 (55.5%)	5 (55.5%)
EGFR		
Positive	5 (55.5%)	5 (55.5%)
Mild positive	4 (44.4%)	4 (44.4%)

Negative	0 (0%)	0 (0%)
pERK		
Positive	0 (0%)	0 (0%)
Mild positive	2 (22.2%)	3 (33.3%)
Negative	5 (55.5%)	4 (44.4%)
Unknown	2 (22.2%)	2 (22.2%)
Cyclin D1		
Positive	7 (77.8%)	5 (55.5%)
Mild positive	0 (0%)	2 (22.2%)
Negative	2 (22.2%)	2 (22.2%)
Survivin		
Strong	1 (11.1%)	1 (11.1%)
Moderate	1 (11.1%)	5 (55.5%)
Mild	4 (44.4%)	2 (22.2%)
Negative	2 (22.2%)	0 (0%)
Unknown	1 (11.1%)	1 (11.1%)

Table 2. MAL-PDT-resistant Bowen's disease patients: comparison of histological variables before and after MAL-PDT.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. **A.** p53 immunostaining in MAL-PDT-sensitive Bowen’s disease (BD) patients (20×): 95% of the cells show positive immunostaining. **B.** Mild cyclin D1 immunostaining in MAL-PDT-sensitive BD patients (40×). **C.** Intense EGFR immunostaining in MAL-PDT-resistant BD patients (10×). **D.** Negative pERK1/2 immunostaining in MAL-PDT-resistant BD patients (10×).

Figure 2. Bar chart shows p53, EGFR, and cyclin D1 expression according to the intensity of immunostaining in BD patients treated with MAL-PDT (responders and non-responders).

Figure 3. **A.** Photodynamic response in SCC and A-431 cell lines. Cells were incubated for 4 h with 1 mM MAL and subsequently exposed to different doses of red light. A-431 cells showed greater sensitivity to MAL than SCC ($p<0.01$) (left). Phase contrast microscopy images of both cell types after irradiation (2.5 J/cm^2) in the presence and absence of 1 mM MAL (right). Scale bar, 100 μm . **B.** Indirect immunofluorescence and Western blot determination of p53 expression in SCC and A-431 cells. p53 is located in the nucleus (top panel). Determination (bottom panel) of P53 expression by Western blot and quantification of expression by measuring relative fluorescence intensity (RFI). Levels of p53 expression were higher in A-431 versus SCC cells ($p<0.01$) and in MAL-resistant cells versus parental cells. GAPDH was used as a loading control. Scale bar, 100 μm .

Figure 4. **A.** Indirect immunofluorescence to measure α -tubulin expression and determine mitotic index in SCC and A-431 cells. α -tubulin is located in the microtubules of the cell. Quantification of mitotic index revealed a significantly higher index in A-431 versus SCC cells ($p<0.05$), and in MAL-PDT-resistant versus parental SCC cells. Scale bar, 50 μm . **B.** Clonogenic assay. Digital and phase-contrast

26

microscopy images showing colonies produced by SCC and A-431 cells (top panel). Scale bar, 200 μ m. Quantification of colony number and size (bottom panel). Larger and more numerous colonies were observed in A-431 versus SCC cells, and in SCC 10G vs SCC P cells. A-431 resistant cells formed more numerous but smaller colonies compared with corresponding parental cells ($p<0.05$).

For Peer Review

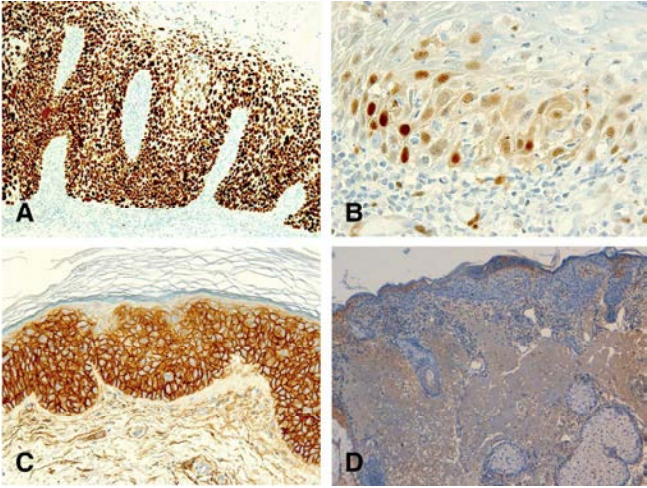


Figure 1.
A. p53 immunostaining in MAL-P
320x240mm (300 x 300 DPI)

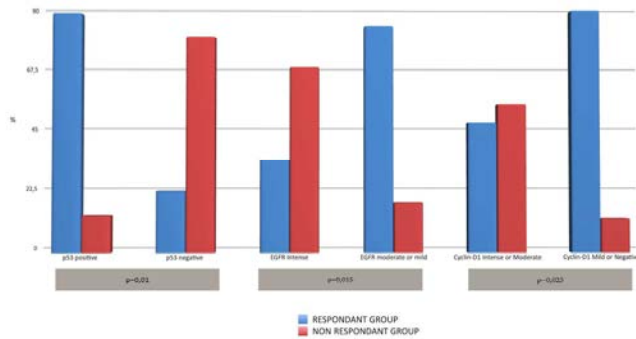


Figure 2.
Bar chart shows p53, EGFR, and
368x207mm (300 x 300 DPI)

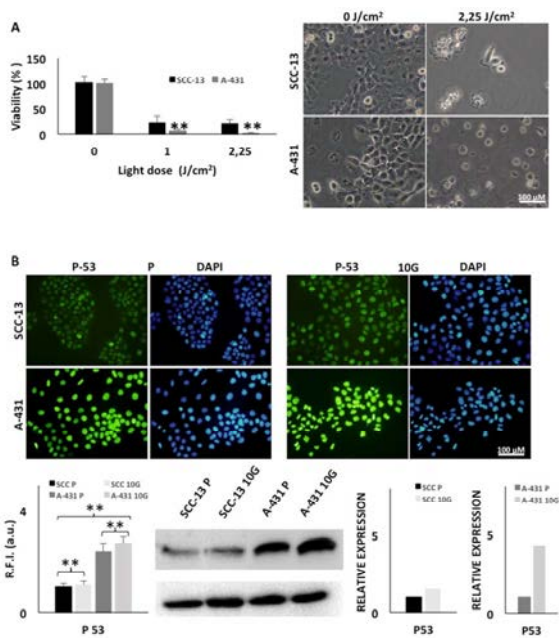


Figure 3.
A. Photodynamic response in SC
254x338mm (300 x 300 DPI)

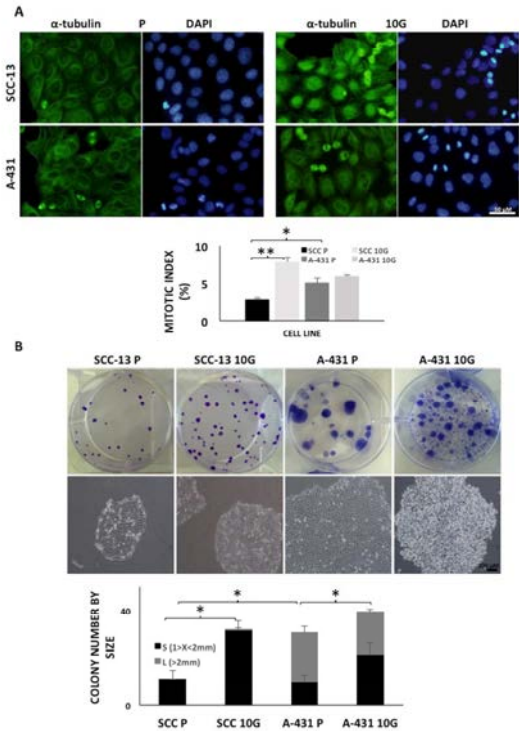



Figure 4.
A. Indirect immunofluorescence
254x338mm (300 x 300 DPI)

De: delphos@fontismedia.com 
Asunto: John Libbey Eurotext [ejd160828] - Decision about your manuscript
Fecha: 12 de marzo de 2017, 10:57
Para: tamgracaz@gmail.com

D

Dear Dr Tamara Gracia-Cazaña,

Thank you very much for your article : ejd160828 "Comparative study of the clinical, histological, and biological characteristics of squamous cell carcinomas in areas previously treated with photodynamic therapy.", which we are delighted to accept for publication.

John Libbey Eurotext will send you the galley proofs together with the copyright transfer form in due course.

As you will have seen in the Instructions to authors, all corresponding authors are asked to pay Page Charges of 200 euros per article accepted. Please note, there is no charge for colour illustrations. An invoice will be sent to the corresponding author at the same time as the proofs, along with the copyright form and information about reprints. The authors of invited articles are not required to pay page charges.

Thank you very much for your contribution and we look forward to working again with you in the near future.

Yours sincerely,

Prof. Ketty Peris
Co-editor
European Journal of Dermatology

Conditions of publication :

The author possesses sole copyright and alone is legally entitled to submit the manuscript for publication.

The author vouches that the work has not been published elsewhere either completely or in part, or in another form. Furthermore, that the manuscript has not been submitted to another journal and will not be published elsewhere after its publication in the above journal. Manuscripts, original illustrations and proofs are kept by the editor and/or publisher for a period of two months after publication of an article, during which time they will be returned to the author only upon written request. After this period unrequested material will be disposed of. With the acceptance of the manuscript, John Libbey Eurotext acquires all publishing rights including those of reprinting, translation and other forms of reproduction (e.g. by photocopying, microfilm or other means including conversion into computer language) of this work according to the provision of the copyright laws in force.

Title **Comparative study of the clinical, histological, and biological characteristics of squamous cell carcinomas in areas previously treated with photodynamic therapy.**

Running head: **Squamous cell carcinomas after photodynamic therapy**

Word count: 2615

Number of figures: 4

Number of tables: 2

T. Gracia Cazaña ¹, N Salazar ², J Vera-Álvarez ³, S González ⁴, A Juarranz ², Y Gilaberte ⁵.

1. Dermatology Service. Hospital de Barbastro, Huesca. Spain.

2. Biology Department. Universidad Autónoma de Madrid. Spain.

3. Pathology Service. Hospital San Jorge, Huesca. Spain.

4. Dermatology Service. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York. United States.

5. Dermatology Service. Hospital San Jorge, Huesca. Spain.

***Corresponding author:** Dr. Tamara Gracia-Cazaña. Department of Dermatology,

Hospital de Barbastro, Huesca. Ctra Nacional 240 s/n – Barbastro, Huesca (Spain). E-

mail: tamgracaz@gmail.com

Founding source: none

Conflict of interest: none declared

SUMMARY

Background: Although Photodynamic therapy (PDT) is an effective treatment option for non-melanoma skin cancer, the development of aggressive tumors in PDT-treated areas has been described.

The objective of our study was to evaluate the clinical, histological, and biological characteristics of squamous cell carcinomas (SCCs) in areas previously treated with PDT vs those arising in areas never treated with this therapeutic modality.

Methods : A retrospective observational study was designed. We collected all cases of invasive SCCs in areas previously treated with PDT. The control group consisted of an equivalent number of SCCs randomly selected from the database of the Pathology Service. Expression of specific markers implicated in SCC progression, including p53, Ki67, COX-2, cyclin D1, E-cadherin, EGFR, survivin, and pERK, was analyzed..

Results: A total of 699 patients were treated with PDT for NMSC during the course of the study. Ten invasive SCCs arising in areas previously treated with MAL-PDT were diagnosed in 6 patients. The control group consisted of 10 invasive SCCs from 10 patients never treated with PDT. In the prior PDT group the mean tumor size was significantly lower and the absence of ulceration was more frequent than in the control group, ($p<0.024$ and $p=0.035$, respectively). A diffuse survivin staining pattern was observed in 90% of tumors in the prior-PDT group versus 50% in the comparative group ($p=0.141$).

Conclusion: The number of SCCs arising in areas previously treated with PDT was very low, and did not differ significantly from that of SCCs developing in non-PDT-treated areas.

Comparative study of the clinical, histological, and biological characteristics of squamous cell carcinomas in areas previously treated with photodynamic therapy.

INTRODUCTION

Photodynamic therapy (PDT) is one of the most used non-invasive treatments for non-melanoma skin cancer (NMSC). PDT is indicated for nodular and superficial basal cell carcinoma (BCC), actinic keratosis (AK), Bowen's disease (BD), and *in situ* squamous cell carcinoma (isSCC).¹

In addition to excellent cosmetic results and a high level of patient satisfaction, advantages of PDT include high complete response rates (91% in BCC, 93% in BD, and 91% in AK, after 3 months of follow-up)²; its potential for combination with other therapies³; and the possibility of treatment repetition when necessary.

SCCs originate from epidermal keratinocytes and have a multifactorial etiology, with ultraviolet (UV) radiation exposure considered the primary risk factor. Unlike UV radiation, PDT does not induce the formation of pyrimidine cyclobutane dimers or photoproducts, and thus has a low carcinogenicity risk.⁴ However, given that photosensitization with aminolevulinic acid (ALA) or other porphyrinic derivatives has been shown to exert genotoxic effects both *in vitro* and *in vivo*, the carcinogenic potential of PDT cannot be ruled out.⁵ Although PDT has a low carcinogenic potential, cases of skin cancer developing in areas previously treated with PDT have been described.⁶ These include keratoacanthoma,⁷ one case of melanoma,⁸ and higher progression rates in cases of BCC and SCC.⁹⁻¹³

Until now, invasive squamous cell carcinoma (iSCC) was considered the result of progression of other tumor types (e.g., AK or BD), as iSCCs often appear in the same cancerization field as these tumors.¹⁴ Fernandez-Figueras et al.¹⁵ reported that direct invasion by proliferating basaloid atypical keratinocytes limited to the epidermal basal layer (AK I) is the most common form of progression to cutaneous iSCC. As such, reasonable doubt exists as to whether iSCCs that develop in areas in which AK or BD tumors were previously treated with PDT do so as a result of natural progression or are influenced by PDT.

The casual relationship between prior PDT and SCC development is difficult to assess. We investigated whether iSCCs arising in areas previously treated with PDT display common distinctive clinical, histological, or molecular characteristics.

MATERIALS AND METHODS

Design

This observational, retrospective study compared the clinical, histological, and molecular characteristics of iSCCs in areas previously treated with PDT with those of iSCCs in patients that had not undergone PDT.

Patients

All iSCCs analyzed developed in areas underwent to PDT between January 2006 and December 2015 at the Dermatology Service of San Jorge Hospital (Huesca, Spain). A control group was created consisting of an equivalent number of the same tumor type, randomly selected from the database of the Pathology Service of the same hospital.

PDT procedure

Patients in the prior-PDT group had received PDT for AK, BCC, or BD. In all cases, 160 mg/g of methyl aminolevulinate cream (Metvix®) was applied and incubated for 3 hours under occlusion, followed by 8 minutes of illumination with a coherent, monochromatic red light source using a diode system (630 nm, 37 J/cm², Aktilite®). PpIX fluorescence was routinely assessed before and after treatment.

Clinical evaluation

The clinical variables studied were age, sex, history of previous NMSC, tumor size and location, prior treatments in the affected area, and history of predisposing immunosuppression. All patients who underwent PDT were treated for actinic keratosis, iSCC, or superficial BCC.

Histological evaluation

Hematoxylin-eosin-stained sections were examined using an Olympus BX61 microscope (Olympus, Center Valley, PA) coupled to a DP50 CCD digital camera. Images were processed using Adobe Photoshop CS5 Extended (Version 12, Adobe Systems).

In each SCC, the following variables were evaluated: Clark's level of invasion; tumoral thickness; cellular differentiation (Broder scale); presence or absence of ulceration; intensity of solar elastosis and inflammation (light, moderate, or intense); and number of mitoses per high-power field (Fig. 1).¹⁶

Immunohistochemistry

Biological markers implicated in either SCC progression¹⁷ or in a possible mechanism of PDT resistance, based on previous findings by our group,^{11,18} were analyzed by immunohistochemistry using rabbit monoclonal antibodies against phospho-Erk1/2 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, 1/50), cyclin D1 (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, prediluted), EGFR (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, prediluted), survivin (Abcam, Cambridge, MA, 1/400), Ki-67 (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, prediluted), and COX-2 (Cell Marque Corporation, Rocklin, CA, prediluted); and mouse monoclonal antibodies against E-cadherin (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, prediluted) and p53 (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, prediluted).

Sections derived from human skin biopsies were subjected to automated immunostaining (TechMate 500, BioTech Solutions, Dako, Glostrup, Denmark) and then incubated using a detection kit (Chemate, K4001, Dako) in accordance with the manufacturer's recommendations. Color development was achieved using 3-amino-9-ethylcarbazole solution as a chromogen (Dako). Heat-induced epitope retrieval was performed using a pressure cooker. Representative sections were examined using positive and negative controls.¹¹

Immunohistochemical evaluation of p53 and Ki-67 was performed by locating the area of the tumor with the highest level of immunoexpression ("hot-spot") and estimating the average number of mitoses per high-power field (400×). Expression of cyclin D1, EGFR, survivin, E-cadherin, pERK, and COX-2 was semiquantitatively assessed by classifying expression intensity into three categories: 0, absence of staining; 1, mild staining (>0–33% of tumoral cell staining); 2, moderate/strong staining (>33–100% of tumoral cell staining). pERK and survivin staining patterns were defined as focal or diffuse, and survivin staining was additionally classified as predominantly nuclear or

cytoplasmic. All samples were blindly evaluated by a pathologist and a dermatopathologist.

Statistical analysis

Continuous variables were described as the mean and standard deviation (SD), and dichotomous variables in terms of proportions. Associations between qualitative variables were assessed using Pearson's chi-squared test or Fisher's exact test. Given the small sample size, the Mann-Whitney U-test or Kruskal-Wallis test was used to evaluate associations between quantitative variables. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Analyses were performed using SPSS Statistics software for Windows (Version 19.0; IBM Corp, Armonk, NY).

Ethical concerns

The present study was strictly observational, and involved no change to the regular care regimen of participating patients. All tumors analyzed were randomly selected and patient data was anonymized. The study protocol was approved by the Aragón Ethical Committee for Clinical Research (CP-CI PI12/0096).

Results

A total of 699 patients received PDT during the study period. Ten SCCs arising in areas subjected to PDT were diagnosed in 6 of these patients, of whom 1 developed 4 iSCCs and another developed 2 iSCCs. Nine of the 10 cases were treated for multiple AK, two of them also presented a superficial BCC. The remaining case was treated for BD.

In both groups, the majority of SCCs developed in men. The mean age was 82.1 (SD, 3.32) in the prior-PDT group and 89.3 (SD, 5.18) in the control group ($p < 0.02$). In both groups, most tumors were located on the head. A history of prior NMSC was recorded in all patients who received PDT and in 70% of patients who did not. The mean tumor size was significantly greater in control group ($16.7 \text{ mm} \pm 7.73$) as compared with the prior-PDT group ($9.9 \text{ mm} \pm 3.03$) ($p < 0.024$). In the prior-PDT group, 80% of SCCs were treated with cryotherapy and/or topical imiquimod treatment prior to PDT, whereas only 40% of SCCs in the non-PDT were treated with cryotherapy (Table 1).

Patients in the PDT group underwent an average of 4 PDT sessions (median, 5; range, 2–10) before developing SCCs, with a mean interval of 15.7 months (range, 3–46 months). These patients were further divided into 2 subgroups; those who developed only one tumor (n=4) and those who developed more than one tumor (n=2). The former underwent an average of 2.5 sessions, while the latter underwent an average of 5.6 sessions ($p=0.019$). All patient variables are summarized in Table 2.

Histological analysis

- Histological variables

Ulceration was observed in 30% of tumors in the PDT group as compared with 80% in the non-PDT group ($p=0.035$). No significant differences were observed between groups in terms of tumoral thickness (prior-PDT, 3.41 (SD=2.28); control, 4.07 (SD =2.82); $p=0.265$), tumor invasion (70% of patients in each group had a Clark level of IV–V), tumoral differentiation, or number of mitoses (Fig.1). In both groups, all tumors analyzed showed inflammatory infiltration and dermal elastosis. These results are summarized in Table 1.

- Immunohistochemical variables

Immunohistochemistry results are shown in Figure 2 and 3. Of the iSCCs that developed in areas previously exposed to PDT, 80% were immunoreactive to p53, as compared with 60% in the control group ($p=0.329$). Ki-67 positivity was observed in 90% of tumors in both groups. pERK immunostaining in the prior-PDT group revealed focal and diffuse patterns in 66.7% and 33.3% of SCCs, respectively, as compared with 42.9% and 57.1%, respectively, in the control group ($p=0.592$). All tumors showed nuclear survivin staining, which was diffuse in 90% of tumors in the prior-PDT group versus 50% of tumors in the control group ($p=0.141$).

Discussion

The present findings indicate that iSCCs rarely develop in areas of skin previously subjected to PDT (10 SCCs in 699 PDT patients). Furthermore, when iSCCs do appear in PDT-treated areas, they show no histological or immunohistochemical differences with respect to iSCCs that develop in areas of skin not previously exposed to PDT. The fact that iSCCs in the prior-PDT group were significantly smaller, thinner, and less

ulcerated than those of the control group may be due to the more frequent follow-up (every 3-6 months) of patients in the former group as compared with the general population.

Some studies have suggested that, in certain situations, PDT may induce the formation of iSCCs.⁶ Indeed, ALA-PDT has been shown to induce the expression of certain proto-oncogenes (c-jun and c-fos) that are implicated in the carcinogenesis of human epithelial cells.¹⁹ Moreover, MAL-PDT exerts an immunosuppressive effect, which may also contribute to the development of skin cancer.²⁰ In their study of 357 patients subjected to PDT for the treatment of AK, Badazzi et al.¹² described the development of 17 SCCs in skin areas exposed to PDT. Moreover, they found that patients that subsequently developed SCCs had more risk factors for NMSC than PDT-treated patients with who did not develop SCCs, including higher age, male gender, and low skin phototypes. Most patients with SCCs in the site of a lesion previously treated with PDT had more than one tumor, located in photoexposed areas, and larger tumors (8–30 mm) as compared with those who did not developed SCC. Based on their findings, the authors concluded that PDT may contribute to carcinogenesis during the development of SCC. The incidence of SCC in our series was lower than that reported by Badazzi and coworkers, possibly because we included all patients treated with PDT for any NMSC, not just AK. The development of SCC has been described following PDT treatment of AK,²¹ BD,¹⁰ and erythroplasia of Queyrat.²² However, it is important to note that all of these lesions are associated with an implicit risk of developing SCC.¹⁵ A study of the largest series of patients to develop iSCC following MAL-PDT treatment of BD found that 15 patients out of a total of 105 progressed to iSCC, and reported an association between iSCC development and both a personal history of cutaneous SCC and treatment of a higher number of PDT fields.⁶

In the present series, 2 patients from the PDT group developed more than one iSCC, and one patient developed 4 iSCCs. Both cases were clinically very similar, with intense photodamage, epidermal atrophy, and a history of multiple BCC excisions (Fig. 4). Moreover, these 2 patients underwent more PDT sessions (mean=5.6) than those who only developed a single tumor (mean=2.5). This may reflect predisposition, which is influenced by a complex group of factors, including the expression of genes involved in the genesis of NMSC and factors related to the photodynamic process.²³ Thus, although it is not known whether PDT can induce tumor cell resistance in patients, the activation

of oxidative stress genes could contribute to a poor treatment response. PDT-induced activation of gene expression results in increased levels of nuclear factor K (NF-κB), mitogen-activated protein kinase (MAPK), protein kinase B (PKB/Akt), phosphoinositide-3 kinase (PI3K), and cyclooxygenase 2 (COX-2).²⁴ Furthermore, MAL-PDT appears to reduce numbers of local epidermal Langerhans cells.²⁵ *In vitro* studies using the MA104 epithelial cell line (derived from green monkey kidney epithelial cells), Madin-Darby canine kidney (MDCK cells), and HL-60 and K562 cell lines (from chronic myeloid leukemia), have shown that multiple PDT treatments decrease the intracellular concentration of drug due to overexpression of P-glycoprotein (Pgp), which mediates elimination of the photosensitizer.²⁶⁻³⁰

In our series, patients underwent many PDT sessions (median = 5) before developing iSCC. This observation is in line with those of several previous case studies, including a patient who developed an invasive SCC 4 months after 3 sessions of PDT for erythroplasia of Queyrat;²² another who developed a malignant melanoma on the scalp after multiple PDT sessions;⁸ and a patient who developed a keratoacanthoma shortly after receiving PDT for multiple AK on the face.⁷ Based on these findings, we do not recommend exceeding 3 PDT sessions over a 12-month period.

p53 mutations are considered premature aberrations and markers of early carcinogenesis, and are more frequently observed on photoexposed skin before the onset of histological modifications. In our series, the percentage of p53-expressing tumoral cells in iSCCs in the prior-PDT group was lower than that observed in the control group, in agreement with a previous study describing decreased p53 expression in AK patients following a single PDT session.¹⁷

Survivin expression was higher in iSCCs in the prior-PDT group as compared with the control group. Survivin, a member of the group of inhibitory apoptosis proteins (IAPs), is encoded by a gene that is transcriptionally repressed by p53, and survivin expression antagonizes p53-induced cell death.³¹ Roy et al.³² demonstrated that treatments for various tumor types lead to a decrease in survivin expression. Preliminary data indicate that in iSCCs that develop after imiquimod treatment, a cytoplasmic survivin expression pattern, indicating a lack of cytoprotective capacity, dominates over a nuclear pattern (nuclear translocation of survivin induces cell cycle activation and subsequent tumoral progression).³³ We found that SCCs in patients in the prior-PDT

group showed moderate to intense diffuse survivin immunostaining in 90% of cases, as compared with a more focal immunoexpression pattern observed in SCCs in the control group. Lotti and coworkers³⁴ reported that a lack of survivin expression is associated with increased expression of stem cell markers (OCT4, NOTCH1, CD133, β -integrin), thinning of the epidermis, reduced numbers of Ki-67-positive cells, and decreased MMP9 expression, leading to the development of smaller tumors. Moreover, the active form of this IAP, phospho-survivin, is increased in PDT-resistant cells as compared with parental cells, while total survivin levels show no differences between the two cell types.¹⁸ In some SCC cells, MAL-PDT may induce survivin activation, which may constitute a treatment resistance mechanism. Our findings support the hypothesis that repeated PDT sessions over a relatively short period of time may select resistant cells, as has been demonstrated *in vitro*, via a survivin-dependent mechanism.¹⁸

The main limitation of the present study is the small sample size.

In conclusion, SCCs that arise in areas of skin previously treated with PDT for NMSC are rare, and show no clinical or histological differences with respect to SCCs in patients without history of PDT. However, although PDT reduces p53 expression in AK and SCC, in certain patients, usually those with intense photodamage and a medical history of multiple skin cancers, **so that AKs or BD with a high mutagenic burden and cancerogenic potential could be resistant to PDT and therefore they can progress to iSCC**. Given that the patients in the present series underwent multiple PDT sessions (median = 5) within an average time frame of just over one year, we recommend limiting the number of PDT sessions in at-risk patients.

Acknowledgment: This study is part of a FIS investigation project (exp PI15/00974).

References:

1. Szeimies RM, Morton CA, Sidoroff A, et al. Photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer. *Acta Derm Venereol* 2005;85:483-490.

2. Freeman M, Vinciullo C, Francis D, et al. A comparison of photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinate (Metvix) with single cycle cryotherapy in patients with actinic keratosis: a prospective, randomized study. *J Dermatolog Treat* 2003;14:99-106.
3. Lucena SR, Salazar N, Gracia-Cazaña T, et al. Combined Treatments with Photodynamic Therapy for Non-Melanoma Skin Cancer. *Int J Mol Sci* 2015;16:25912-25933.
4. Takahashi H, Nakajima S, Sakata I. ATX-S10(Na)-photodynamic therapy is less carcinogenic for mouse skin compared with ultraviolet B irradiation. *Br J Dermatol* 2005;153:1182-1186.
5. Fuchs J, Weber S, Kaufmann R. Genotoxic potential of porphyrin type photosensitizers with particular emphasis on 5-aminolevulinic acid: implications for clinical photodynamic therapy. *Free Radic Biol Med* 2000;28:537-548
6. Ratour-Bigot C, Chemidling M, Montlahuc C, et al. Squamous Cell Carcinoma Following Photodynamic Therapy for Cutaneous Bowen's Disease in a Series of 105 Patients. *Acta Derm Venereol* 2016;96:658-663.
7. Maydan E, Nootheti PK, Goldman MP. Development of a keratoacanthoma after topical photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid. *J Drugs Dermatol* 2006;5:804-806.
8. Schreml S, Gantner S, Steinbauer J, et al. Melanoma promotion after photodynamic therapy of a suspected Bowen's disease lesion. *Dermatology* 2009;219:279-281.
9. Karen JK, Hale EK. Rapid progression of a basal cell carcinoma after photodynamic therapy. *Dermatol Surg* 2010;36:1328-1331.
10. Liang WM, Theng TS, Lim KS, et al. Rapid development of squamous cell carcinoma after photodynamic therapy. *Dermatol Surg* 2014;40:586-588.
11. Gilaberte Y, Milla L, Salazar N, et al. Cellular intrinsic factors involved in the resistance of squamous cell carcinoma to photodynamic therapy. *J Invest Dermatol* 2014;134:2428-2437.
12. Bardazzi F, Loi C, Magnano M, et al. Methyl-aminolevulinic acid photodynamic therapy for actinic keratoses: a useful treatment or a risk factor? A retrospective study. *J Dermatolog Treat* 2015;26:168-170.
13. Attili Sk, Ibbotson SH, Fleming C. Role of a non-surgical therapies in the management of periocular basal cell carcinoma and squamous intra-epidermal

carcinoma: a case series and review of the literature. *Photoderm, photoimmun, photomedicine* 2012;28:68-79.

14. Ruini C, Witkowski AM, Cesinano A, et al. From actinic keratosis to squamous cell carcinoma: evidence of morphologic and biologic progression. *J Am Acad Dermatol* 2015;72:S8-S10.

15. Fernández-Figueras MT, Carrato C, et al. Actinic keratosis with atypical basal cells (AK I) is the most common lesion associated with invasive squamous cell carcinoma of the skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015;29:991-997.

16. LeBoit PE, Burg G, Weedon D. Pathology and genetics of skin tumors. Lyon: IARC Press; 2006. World health organization classification tumours.

17. Bagazgoitia L, Cuevas Santos J, Juarranz A, et al. Photodynamic therapy reduces the histological features of actinic damage and the expression of early oncogenic markers. *Br J Dermatol* 2011;165:144-151.

18. Milla LN, Cogno IS, Rodríguez ME, et al. Isolation and characterization of squamous carcinoma cells resistant to photodynamic therapy. *J Cell Biochem* 2011;112:2266-2278.

19. Kick G, Messer G, lewig G, et al. Strong and prolonged induction of c-jun and c-fos proto-oncogenes by photodynamic therapy. *Br J Cancer* 1996; 74:30-36.

20. Thanos SM, Halliday GM, Damian DL. Nicotinamide reduces photodynamic therapy-induced immunosuppression in humans. *Br J Dermatol* 2012; 167:631-636.

21. Calista D. Development of squamous cell carcinoma after photodynamic therapy with methyl aminoleuvulinate. *Br J Dermatol* 2014; 171:905-908.

22. Varma S, Holt PJ, Anstey AV. Erythroplasia of Queyrat treated by topical aminolaevulinic acid photodynamic therapy: a cautionary tale. *Br J Dermatol* 2000; 142:825-826.

23. Casas A, Di Venosa G, Hasan T, et al. Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. *Curr Med Chem* 2011;18:2486-2515.

24. Muthusamy V, Piva TJ. The UV response of the skin: A review of the MAPK, NF- κ B and TNF- α signal transduction pathways. *Arch. Dermatol Res* 2010;302:5-17.

25. Evangelou G, Farrar MD, Cotterell L, et al. Topical photodynamic therapy significantly reduces epidermal Langerhans cells during clinical treatment of basal cell carcinoma. *Br. J. Dermatol* 2012;166:1112-1115.

26. Luna MC, Gomer CJ. Isolation and initial characterization of mouse tumor cells resistant to porphyrin-mediated photodynamic therapy. *Cancer Res* 1991;51:4243-4249.

27. Rebutti M, Michiels C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochem Pharmacol* 2013;85:1219-1226.
28. Trindade GS, Farias SL, Rumjanek VM, et al. Methylene blue reverts multidrug resistance: sensitivity of multidrug resistant cells to this dye and its photodynamic action. *Cancer Lett* 2000;151:161-167.
29. Tsai T, Hong RL, Tsai JC, et al. Effect of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on MCF-7 and MCF-7/ADR cells. *Lasers Surg Med* 2004;34:62-72.
30. Weyergang A, Berstad ME, Bull-Hansen B, et al. Photochemical activation of drugs for the treatment of therapy-resistant cancers. *Photochem Photobiol Sci* 2015;14:1465-1475.
31. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, et al. Transcriptional repression of the antiapoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* 2002; 277:3247-3257.
32. Roy P, Nigam N, George J, et al. Induction of apoptosis by tea polyphenols mediated through mitochondrial cell death pathway in mouse skin tumors. *Cancer Biol The.* 2009;8:1281-1287
33. Dallaglio K, Marconi A, Pincelli C. Survivin: a dual player in healthy and diseased skin. *J Invest Dermatol* 2012;132:18-27.
34. Lotti R, Palazzo E, Petrachi T, et al. Survivin Modulates Squamous Cell Carcinoma-Derived Stem-Like Cell Proliferation, Viability and Tumor Formation in Vivo. *Int J Mol Sci* 2016;17:E89.

Figure 1. **(A)** Ulceration of squamous cell carcinoma (H&E, 10×). **(B)** Accumulation of abnormal elastin (elastic tissue) in the dermis (H&E, 10×). **(C)** Mitoses per HPF and peritumoral inflammatory infiltrate.

Figure 2. Graph showing intensity of staining (pERK 10x [mild], COX-2 20x [moderate] and cyclin D1 40x [intense]) in SCCs in skin areas previously subjected PDT versus those in non-PDT patients.

Figure 3. Graph showing intensity of staining (EGFR 20x [intense], E-cadherin 20x [intense], and survivin 40x [mild]) in SCCs in skin areas previously subjected PDT versus those in non-PDT patients.

Figure 4. **(A)** Patient treated with MAL-PDT for multiple actinic keratoses. **(B)** Lesion clearance rate of 75% after treatment with MAL-PDT. **(C)** SCC in area of skin previously treated with PDT.

Parameters		SCC in areas previously treated with PDT (N=10)	SCC in areas not treated with PDT (N=10)	p value
Age		82.1	89.3	p<0.02
Predisposing factors	Yes	10%	20%	NA
	No	90%	80%	
Gender	Male	90%	20%	p=0.531
	Female	10%	80%	
Previous NMSC	Yes	100%	80%	p=0.211
	No	0%	20%	
Size		9.9 mm	16.7 mm	p=0.024
Location	Head	90 %	80 %	p=0.265
	Upper limbs	10%	10%	
	Lower limbs	0%	10%	
Previous treatments of tumor area	Yes	80%	40%	p=0.199
	No	20%	60%	
Clark's level of invasion	I	0%	0%	p=0.221
	II	0%	20%	
	III	30%	10%	
	IV	60%	40%	
	V	10%	30%	
Tumoral thickness		3.41 (SD=2.28)	4.07 (SD=2.82)	p= 0.265

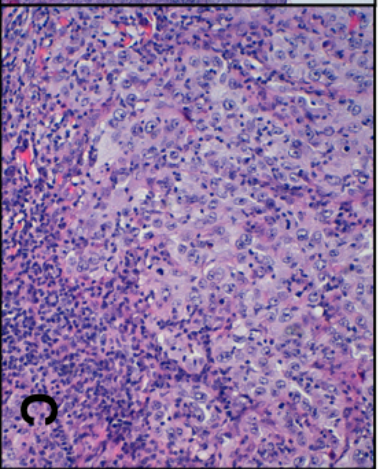
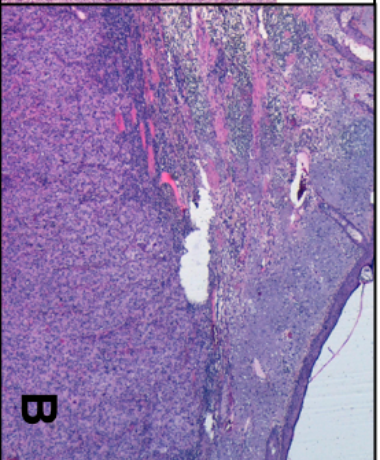
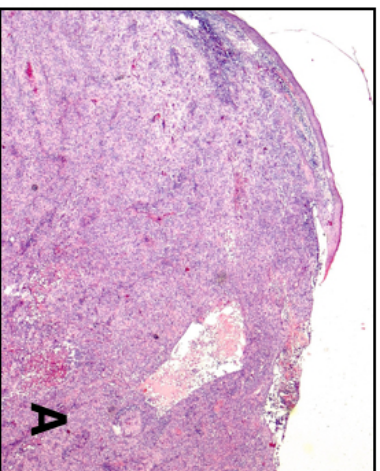
Broder scale	I	30%	30%	p=0.497
	II	40%	60%	
	III	30%	10%	
	IV	0%	0%	
Elastosis	Yes	100%	100%	NA
	No	0%	0%	
Inflammation	Yes	100%	100%	NA
	No	0%	0%	
Mitoses		0.84 mitoses/HPF	0.87 mitoses/HPF	p=0.956
Ulceration	Yes	30%	80%	p=0.035
	No	70%	20%	

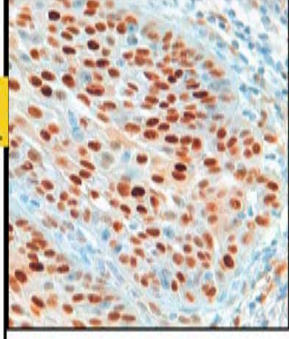
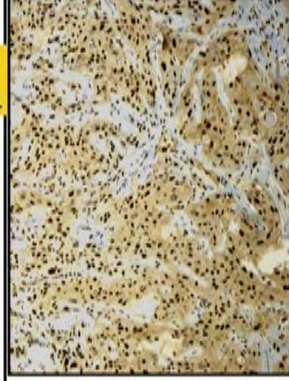
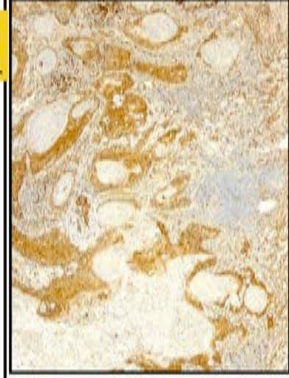
Table 1. Comparative table summarizing the clinical and histological characteristics of squamous cell carcinomas in areas previously treated with photodynamic therapy versus those not. HPF, high power field; NA, not available.

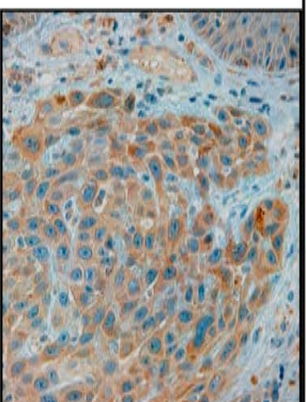
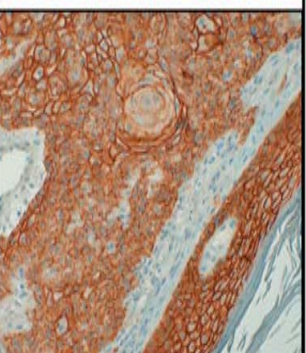
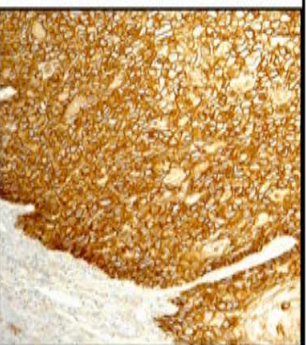
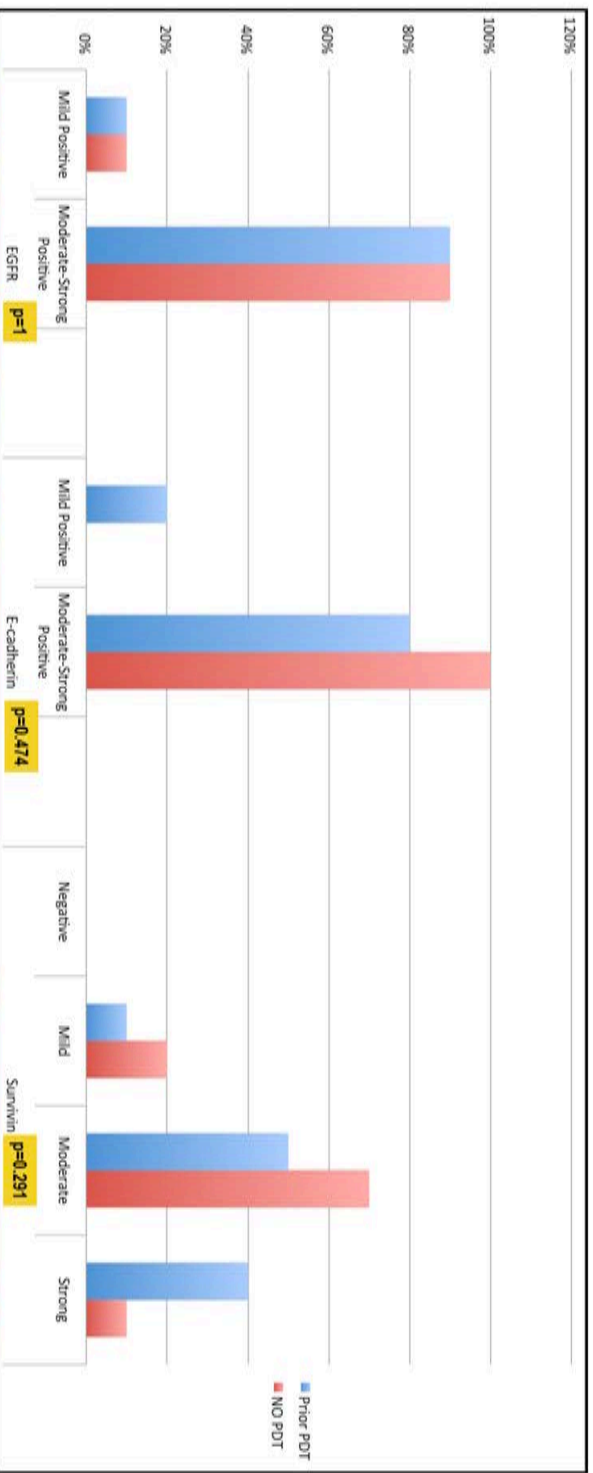
Parameters		Patients with >1 SCC	Patients with single SCC	p value
Age		81.3 (SD, 2.73)	83.25 (SD, 4.19)	0.402
Size		10.5 (SD, 2.95)	9 (SD, 3.36)	0.477
Number of PDT sessions		5.66 (SD, 1.96)	2.5 (SD, 1)	0.019
Tumoral thickness		3.26 (SD,1.84)	3.6 (SD,3.15)	0.824
Mitoses/hpf		0.4 (SD,0.98)	1.5 (SD,1.82)	0.245
Ulceration	Yes	50%	0%	0.2
	No	50%	100%	
Clark's level of invasion	III	33.3%	50%	0.517
	IV	66.7%	25%	
	V	0%	25%	
Broder scale	I	16.7%	50%	0.517
	II	50%	25%	
	III	33.3%	25%	
p53	Positive	83.3%	100%	0.667
	Negative	16.7%	0%	
E-cadherin	Positive	66.7%	100%	0.467
	Negative	33.3%	0%	
EGFR	Strong and Moderate Positive	83.3	100%	0.6
	Mild positive	16.7%	0%	
Cyclin D1	Strong and Moderate Positive	83.3	100%	0.6
	Mild positive	16.7%	0%	
Cox2	Strong and Moderate Positive	50%	50%	ND
	Mild positive	50%	50%	
pERK	Negative	33.3%	50%	0.808
	Mild positive	16.7%	25%	
	Moderate positive	16.7%	0%	
	Strong positive	33.3%	25%	
Survivin	Mild positive	16.7%	0%	0.392

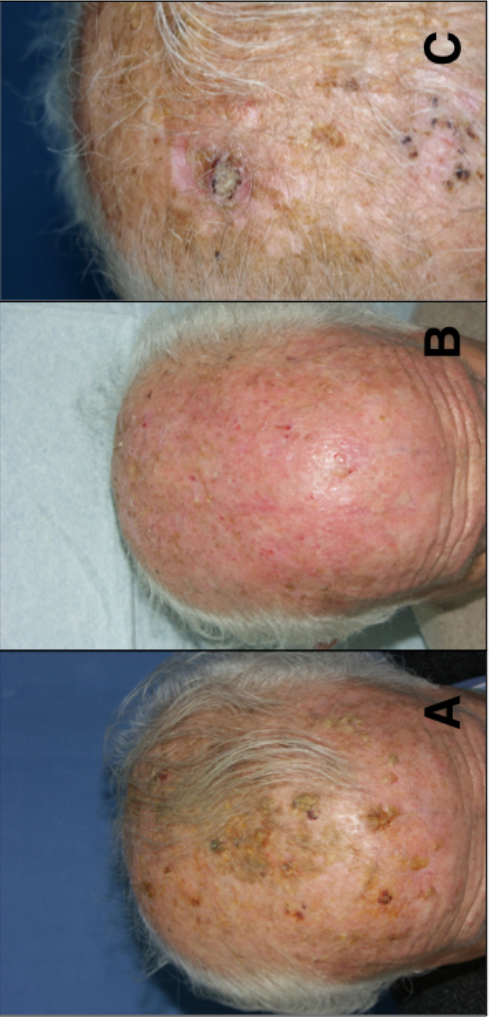
	Moderate positive	33.3%	75%	
	Strong positive	50%	25%	
p53%		31.67 (SD, 23.17)	30.5 (SD, 44.77)	0.958
Ki-67%		42.5 (SD, 22.75)	52.75 (SD, 27.88)	0.540

Table 2. Clinical, histological, and immunohistochemical data for PDT-treated who developed a single SCC versus those who developed multiple SCCs.









N	Patient	Age (years)	Predisposing factors	Gender	Previous NMSC	Tumor size (mm)	Location	Number of PDT sessions	Pathology for which prior PDT was administered	Time interval (months)	Previous treatments in tumor area
1	1	82	No	Male	Yes	10	Forehead	4	AK	3	Cryotherapy
2	1	83	No	Male	Yes	10	Cheek	10	AK	31	Cryotherapy
3	1	83	No	Male	Yes	6	Forehead	4	AK	19	Cryotherapy
4	1	84	No	Male	Yes	12	Cheek	10	AK	46	Cryotherapy
5	2	82	No	Male	Yes	5	Temple	2	BD	4	No
6	3	77	No	Male	Yes	10	Forehead	6	AK and sBCC	3	Cryotherapy
7	3	79	No	Male	Yes	15	Forehead	4	AK and sBCC	21	Cryotherapy
8	4	89	No	Male	Yes	10	Cheek	2	AK	12	No

9	5	79	No			Male	Yes	13	Scalp	6		AK	10		Imiquimod
10	6	83	No			Female	Yes	8	Hand	2		AK	8		Cryotherapy
11	7	93	No			Male	Yes	10	Cheek	0					No
12	8	90	No			Male	No	12	Zygomatic area	0					Cryotherapy
13	9	93	No			Male	Yes	30	Preauricular area	0					No
14	10	94	No			Female	Yes	30	Zygomatic area	0					Cryotherapy
15	11	93	No			Male	Yes	15	Leg	0					No
16	12	84	No			Male	No	8	Forehead	0					Cryotherapy
17	13	82	No			Male	Yes	20	Forehead	0					No
18	14	85	No			Male	Yes	15	Hand	0					No

19	15	81	No	Female	No	15	Hand	0			No
20	16	94	No	Male	Yes	12	Scalp	0			Cryotherapy

Supplementary Table. Clinical characteristics of patients included in the study. Tumors 1–10 pertain to the group that developed SCCs in areas previously treated with PDT, while tumors 11–20 pertain to the control (non-PDT) group. (AK, actinic keratosis; BD, Bowen disease; sBCC, superficial basal cell carcinoma).



Universidad
Zaragoza